

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E. A. P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Perfil molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras biológicas del tracto respiratorio inferior de pacientes limeños con sospecha de tuberculosis

TESIS

para optar el título profesional de Biólogo con Mención en Biología Celular
y Genética

AUTORA

Dora Graciela Quispe Huamanquispe

ASESORES

Ivonne Guerrero Alva

Ruth García De La Guarda

Lima - Perú

2009

Dedicatoria:

A mis padres, Dora y Marcelino, por su esfuerzo, sacrificio y ejemplo de superación.

A mi hermano Angel, por su apoyo incondicional durante todas las etapas de mi vida.

A mi querido tío Constantino, que me cuida desde el cielo.

Agradecimientos:

A Dios, por no haberme dejado nunca en los momentos difíciles, y por las oportunidades que siempre me da.

A mis padres por confiar en mi y enseñarme a luchar para conseguir mis metas, a mi hermano Angel por estar siempre conmigo apoyándome en todo momento y a mi sobrina Angie por arrancarme siempre una sonrisa con sus ocurrencias.

A la Dra. Blga. Ivonne Guerrero Alva por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación, ser mi asesora y apoyarme con sus conocimientos y consejos.

Al Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular Oncológico “MAMLAB” por brindarme todas las facilidades en sus instalaciones para realizar el presente trabajo.

A mi co-asesora la Mg. Ruth García de la Guarda por el tiempo compartido y su apoyo en este trabajo.

A los biólogos Roberto Mejía Farro, Jaime Burneo Valderrama y Marco Galarza Pérez por los primeros conocimientos adquiridos y los momentos compartidos durante mi estadía en la Unidad de Biología Molecular Oncológica (INEN).

A la Sra. Diana Astete Letona por su gran amistad y compañía durante el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos de la universidad: Hada Ramírez, Fanny Reyes, Jenny Quispe, Dan Vivas, Jeanette Orbegoza y Julio Mendoza por todo su cariño y amistad sincera.

A mis amigos de siempre: Magaly Gavancho, Esther Salcedo, Marivel Pereyra y Melvin Fernández por todos los gratos momentos vividos y porque cada uno de ustedes ha forjado una parte de la persona que soy ahora.

A Milton Untiveros y Rosalina Tincopa por su apoyo, compañía y valiosos consejos brindados en esta última etapa.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.2.	Objetivos de la investigación.	2
1.2.1.	Objetivo General.	2
1.2.2.	Objetivos Específicos.	2
II.	ANTECEDENTES	3
2.1.	Tuberculosis en el Perú.	3
2.2.	Micobacterias.	4
2.3.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	5
2.4.	Patogénesis de la tuberculosis pulmonar.	7
2.5.	Métodos clásicos de diagnóstico de tuberculosis.	10
2.5.1.	Baciloscopía.	10
2.5.2.	Cultivo.	12
2.6.	Detección molecular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	13
2.7.	Muestras biológicas procedentes del Tracto Respiratorio Inferior (TRI).	17
2.7.1.	Tracto Respiratorio Inferior.	17
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1.	Materiales.	19
3.1.1.	Material biológico.	19
3.1.2.	Material de laboratorio.	19
3.2.	Métodos.	21
3.2.1.	Obtención del material biológico.	21
3.2.1.	Transporte y conservación de muestras.	22
3.2.3.	Método experimental.	23
3.2.1.1.	Aislamiento y purificación del material genético, DNA, de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	23

3.2.3.2. Determinación de la concentración de DNA extraído por Espectrofotometría.	25
3.2.3.3. Amplificación de la secuencia génica mediante <i>PCR-Nested</i> .	25
3.2.3.4. Electroforesis en geles de agarosa de los productos amplificados.	29
3.2.3.5. Detección de los productos por Tinción con Bromuro de Etidio.	30
3.2.4. Método de análisis.	30
3.2.4.1. Procedencia de las muestras biológicas.	31
3.2.4.2. Presencia de contaminantes en las muestras biológicas.	31
3.2.4.3. Expresión de la secuencia génica de la proteína A (65KDa) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en el primer y segundo evento de amplificación.	31
3.2.4.4. Intensidad de las bandas en los electroferogramas.	32
3.2.4.5. Análisis de la sensibilidad y especificidad de los dos eventos de amplificación para la detección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	32
IV. RESULTADOS	33
4.1. Datos demográficos.	33
4.2. Procedencia de las muestras.	37
4.2.1. Distribución de las muestras según los métodos de obtención del material biológico.	37
4.3. Calidad del material biológico.	37
4.3.1. Distribución de las muestras según la calidad del material biológico.	37
4.4. Geno-Identificación de la secuencia correspondiente a la proteína A (65KDa) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	39
4.4.1. Frecuencia de la secuencia génica de la proteína A (65KDa) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> según el método de obtención del material biológico.	40
4.4.1.1. Perfil génico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en muestras biológicas del TRI.	41
4.4.2. Identificación de la secuencia génica de la proteína A (65KDa) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de acuerdo a la calidad del material biológico.	42

4.5.	Análisis de la especificidad y sensibilidad de la prueba <i>PCR-Nested</i> en la detección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	43
4.5.1.	Especificidad de la prueba <i>PCR-Nested</i> en la detección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	43
4.5.2.	Sensibilidad de la prueba <i>PCR-Nested</i> en la detección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	45
4.5.3.	Patrones de visualización electroforética obtenidos mediante <i>PCR-Nested</i> en la detección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	46
V.	DISCUSIÓN	49
5.1.	Procedencia de las muestras.	49
5.2.	Calidad del material biológico.	50
5.3.	Geno-Identificación de la secuencia correspondiente a la proteína A (65KDa) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	52
5.3.1.	Patrones de visualización electroforética obtenidos mediante <i>PCR-Nested</i> en la detección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	52
5.4.	Análisis de la sensibilidad y especificidad de los dos eventos de amplificación para la detección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	54
VI.	CONCLUSIONES	57
VII.	RECOMENDACIONES	58
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1.-	Micobacterias Patógenas.	5
TABLA N°2.-	Características de los principales métodos de diagnóstico en tuberculosis.	14
TABLA N°3.-	Secuencia de los cebadores externos usados en la <i>PCR - First</i> (Shinnick, 1987).	27
TABLA N°4.-	Secuencia de los cebadores internos usados en la <i>PCR-Nested</i> (Shinnick, 1987).	27
TABLA N° 5.-	Programa <i>PCR-First</i> .	29
TABLA N°6.-	Programa <i>PCR-Nested</i> .	29
TABLA N°7.-	Datos demográficos de los pacientes estudiados.	34
TABLA N° 8.-	Número de pacientes por grupos etáreos.	36
TABLA N° 9.-	Score de calidad del material biológico.	38
TABLA N° 10.-	Score de calidad del material biológico según la procedencia de la muestra.	39
TABLA N° 11.-	Resultados “DNA MBT-PCR”.	40
TABLA N°12.-	Frecuencia de DNA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> según el método de obtención de las muestras.	41
TABLA N° 13.-	Perfil génico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en el TRI.	42
TABLA N°14.-	Frecuencia de <i>MBT</i> vs Score de calidad del material biológico.	43
TABLA N° 15.-	Frecuencia de DNA MBT detectado mediante <i>PCR-First</i> .	45
TABLA N° 16.-	Frecuencia de DNA MBT detectado mediante <i>PCR-Nested</i> .	45

TABLA N° 17.-	Patrones de visualización electroforética post <i>PCR-Nested</i>	47
TABLA N° 18.-	Patrones de visualización electroforética en los diferentes métodos de obtención del material biológico.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1.-	Patogénesis de la tuberculosis.	8
FIGURA N° 2.-	Los cinco estadíos de la tuberculosis pulmonar.	9
FIGURA N° 3.-	Identificación de Bacilos Ácido-Alcohol Resistentes (BAAR) mediante baciloscopía.	11
FIGURA N° 4.-	Identificación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mediante cultivo.	13
FIGURA N° 5.-	Tracto Respiratorio Inferior.	18
FIGURA N° 6.-	Amplificación genética mediante PCR.	26
FIGURA N° 7.-	<i>PCR- Nested.</i>	28
FIGURA N° 8.-	Distribución de los casos estudiados según su género.	33
FIGURA N° 9.-	Distribución de las muestras biológicas según el método de obtención.	37
FIGURA N° 10.-	Electroforesis de los productos amplificados y sus controles negativos.	44
FIGURA N° 11.-	Electroforesis de los productos amplificados y sus controles positivos.	44

RESUMEN:

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial principalmente en países en vías de desarrollo, como el Perú. Las limitaciones de los métodos clásicos de diagnóstico (baciloscopia y cultivo) así como la alta frecuencia de esta enfermedad han creado la necesidad de implementar nuevas estrategias para incrementar la sensibilidad de las pruebas y a su vez reducir el tiempo necesario para establecer el diagnóstico confirmatorio. Considerando que los estudios correspondientes a la región del Tracto Respiratorio Inferior (TRI) son escasos, el objetivo de esta tesis fue determinar el perfil molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras biológicas del TRI de pacientes limeños con sospecha de tuberculosis.

En el presente trabajo se evaluaron 43 muestras de pacientes limeños con sospecha clínica de tuberculosis las cuales fueron obtenidas a través de lavado bronquial, aspirado bronquial, secreción bronquial, lavado bronco-alveolar, aspirado bronco-alveolar y broncofibroscopia. De estas muestras se extrajo DNA y se realizó la prueba del *PCR - Nested*, para ello se empleó como secuencia diana el gen de la proteína A (65KDa) de *Mycobacterium tuberculosis*, los productos amplificados fueron evidenciados mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Los resultados obtenidos muestran que el 77% de las muestras procesadas poseen DNA de *Mycobacterium tuberculosis*, demostrándose la alta sensibilidad y especificidad del método empleado, el 82% de estas muestras correspondieron a la región del árbol bronquial superior, debido a que esta región es el punto de partida para la diseminación de esta micobacteria hacia otras regiones del tracto respiratorio y además, a que la mayoría de muestras fueron tomadas directamente de esta región. Asimismo, la aplicación de la prueba *PCR- Nested* incrementó la sensibilidad de detección 5.5 veces con respecto a un único evento de amplificación, lo cual demuestra la utilidad de esta prueba en el análisis de material biológico con baja carga micobacteriana como las empleadas en este trabajo. Finalmente, se concluye que la prueba *PCR- Nested* es un método altamente sensible y específico para detectar DNA de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras procedentes del TRI.

Palabras claves: *Mycobacterium tuberculosis*, Tracto Respiratorio Inferior (TRI), *PCR- Nested*, perfil molecular, árbol bronquial superior.

SUMMARY

Tuberculosis is an infectious disease that constitutes a serious public health problem worldwide, mainly in developing countries such as Peru. The limitations of the traditional methods of diagnosis (smear and culture) as well as the high incidence of this disease have created the need to implement new strategies to increase the sensitivity of tests to reduce time to establish a confirmed diagnosis. Since there are not many researches at the region of the Lower Respiratory Tract (LRT), the objective of this study was to determine the molecular profile of *Mycobacterium tuberculosis* in biological samples taken from the LRT of patients with suspicion tuberculosis.

In the present study, 43 samples from patients with clinical suspicion of tuberculosis were evaluated. The samples were obtained through bronchial lavage, bronchial aspirate, bronchial secretions, bronco-alveolar lavage, and sucked bronco-alveolar broncofibroscopy. DNA extraction was prepared from each sample, and it was used in a *PCR- Nested* test targeting the gene encoding the protein A (65KDa) from *M. tuberculosis*. The results showed that DNA from *M. tuberculosis* was detected in 77% of the processed samples, revealing a high sensitivity and specificity of this method. From the positive samples, 82% corresponded to those obtained from the bronchial tree top region. This last result is explained because of the fact that most of the samples were taken directly from this region, which is the starting point for the mycobacteria dissemination toward other regions of the respiratory tract. In addition, the application of the *PCR-Nested* test increased the sensitivity of detection by 5.5 fold compared to a single event amplification, demonstrating the usefulness of this test in the analysis of biological material with low mycobacterial load as those used in this work. Finally, we conclude that the *PCR-Nested* test is a highly sensitive and specific method for detecting DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in samples from the LRT.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Lower Respiratory Tract (LRT), *PCR-Nested*, molecular profile, bronchial tree top region.

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial principalmente en países en vías de desarrollo, como el Perú. Diversos factores contribuyen a la complejidad del control de esta enfermedad, entre los que se cuentan: la necesidad de supervisar el cumplimiento del tratamiento, la existencia de situaciones de inmunodepresión, las dificultades para un diagnóstico rápido y oportuno, la multiresistencia, etc.

El diagnóstico clásico de la tuberculosis se ha basado en el cultivo y la baciloscopía. El cultivo es considerado el método más sensible pudiendo alcanzar el 90% en las formas pulmonares. No obstante su principal inconveniente es que demora de 15 días a 2 meses para la aparición de colonias por lo que no es de utilidad en el diagnóstico rápido. Asimismo, es de baja sensibilidad cuando se analizan muestras biológicas que contienen un pequeño número de microorganismos. A su vez, la baciloscopía es considerada el método más rápido existente, posee una especificidad alta y un costo reducido por lo que constituye la principal herramienta diagnóstica en muchos países en vías de desarrollo, como el nuestro, en los que la incidencia de la enfermedad es elevada. Sin embargo, su sensibilidad es limitada variando entre 30 y 80% dependiendo del número de bacilos/ml, el aislamiento en cultivo, métodos de recuperación utilizados y la población analizada (Morán y cols, 2000).

Las limitaciones de estos métodos y la alta frecuencia de la enfermedad han creado la necesidad de implementar nuevas estrategias para disminuir el tiempo necesario para el diagnóstico de esta enfermedad, así como también incrementar la sensibilidad de las pruebas. Un gran avance en este campo es la incorporación de métodos de biología molecular, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction; PCR) en el diagnóstico confirmatorio de la tuberculosis. Este método permite detectar material genético específico de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras biológicas o de cultivo, permitiendo establecer el diagnóstico en 1-3 días, en lugar de las 2- 4 semanas del cultivo. Dicha detección es posible independientemente de la viabilidad de la bacteria. Asimismo, existen variantes de la PCR como la *PCR-Nested*, la cual incrementa la sensibilidad de la prueba sin sacrificar la especificidad, como se ha

reportado en los trabajos anteriores como los de Pierre et al (1991) y Miyazaki et al (1993) donde se demostró que la detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante dos eventos de amplificación (*PCR-Nested*) incrementa la sensibilidad y la especificidad con respecto a un solo evento de amplificación (Pierre et al, 1991) y a los métodos microbiológicos convencionales (Miyazaki et al, 1993).

Por lo antes expuesto, en el presente trabajo se plantea establecer el perfil molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras biológicas provenientes del tracto respiratorio inferior (TRI) de pacientes limeños con sospecha de tuberculosis, con el fin de determinar las áreas de esta región susceptibles de ser infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*.

1.2. Objetivos de la investigación:

1.2.1. Objetivo General

- Determinar el perfil molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras biológicas del tracto respiratorio inferior (TRI) de pacientes limeños con sospecha de tuberculosis.

1.2.2. Objetivos Específicos:

- Determinar la frecuencia de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras biológicas del tracto respiratorio inferior (TRI) mediante *PCR- Nested*.
- Determinar la frecuencia de *Mycobacterium tuberculosis* de acuerdo a la procedencia de las muestras biológicas del tracto respiratorio inferior.
- Determinar la frecuencia de *Mycobacterium tuberculosis* en el primer y segundo evento de amplificación.
- Comparar la sensibilidad y especificidad entre los dos eventos de amplificación por PCR para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras biológicas del tracto respiratorio inferior.

II. ANTECEDENTES

2.1. Tuberculosis en el Perú

Hace casi 120 años, en 1882, Robert Koch identificó el agente etiológico de la tuberculosis, el *Mycobacterium tuberculosis*, también denominado bacilo de Koch. En la actualidad la tuberculosis es una enfermedad infecciosa que constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial sobretodo en países en vías de desarrollo como el Perú. La OMS (Organización Mundial de la Salud) estima que 1,3 millones de personas murieron de tuberculosis en el 2007 (OMS, 2009). En el Perú es la principal enfermedad social totalmente curable que afecta a la población económicamente activa, siendo los adolescentes y adultos mayores la tercera parte de los casos.

Las últimas cifras publicadas por el Ministerio de Salud (MINSA, 2009) señalan que, durante el año 2007, se han diagnosticado y tratado gratuitamente a 34,534 personas enfermas con tuberculosis en todo el país, cifra que traducida en tasa de morbilidad es de **125/100,000 hab.**, considerándose al Perú como segundo país con más alta tasa de morbilidad e incidencia en la región. Cabe resaltar que, del total de casos diagnosticado en el año 2007, el **58%** corresponde a las Direcciones de Salud de Lima y Callao. Asimismo se puede observar que la incidencia de esta enfermedad en el interior del país no es uniforme siendo Loreto, Ucayali, Madre de Dios, Ica y Tacna, los departamentos que reportan el mayor número de casos.

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos, el Perú no ha podido detener el ingreso de nuevas amenazas surgidas en el mundo, como lo son la Tuberculosis Multidrogoresistente (TB MDR) y la Tuberculosis de Extrema Resistencia (TB XDR). Los estudios de vigilancia de resistencia a medicamentos antituberculosos, realizados por el Ministerio de Salud, durante los años 1995-1996 señalan que el 2,4% de pacientes con TBMDR presenta resistencia primaria, mientras que el 15% corresponde a resistencia adquirida; en el 2005 estos datos fueron 5,3% y 23,2% respectivamente (MINSA,2009). Actualmente, nuestro país ocupa el primer lugar en reportar más casos de TB MDR Y TB XDR en todo el continente americano (Mendoza y cols, 2008).

Por otro parte, existe una estrecha relación entre el SIDA y la tuberculosis. Por lo tanto, la propagación de la infección por VIH entre la población con una elevada prevalencia de infección de tuberculosis, está teniendo como consecuencia un aumento considerable de ésta (Prescott, 1999). El Perú no es ajeno a ello, por lo que en el año 2007 la asociación VIH-SIDA-Tuberculosis, notificada por el Ministerio de Salud, representó el 2,49% de la morbilidad general por tuberculosis. Observándose que la letalidad de esta enfermedad es alta en los pacientes coinfectados probablemente debido a complicaciones asociadas con el SIDA o un diagnóstico tardío de tuberculosis (MINSA, 2009).

2.2. Micobacterias

Bajo este término, se agrupa un conjunto de microorganismos que comparten las características de morfología bacilar y de ser ácido alcohol resistentes. Aunque no toman la coloración Gram, sus paredes celulares tienen la estructura de bacterias Gram positivas. Además de muchas especies saprofitas, el grupo comprende microorganismos patógenos (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*) que causan enfermedades crónicas con lesiones del tipo de granuloma infeccioso en el hombre (Jawetz, 1992).

Existen más de 100 especies de micobacterias reconocidas, las cuales son bacilos aerobios que no forman esporas y son inmóviles, de 0,2 a 0,6 μ de ancho y de 1,0 a 10 μ de largo, ligeramente curvos o rectos, que a veces se ramifican o forman filamentos (Carmona, 1997).

El desarrollo y perfeccionamiento del cultivo, de las pruebas bioquímicas y, más recientemente, de métodos de biología molecular, han permitido clasificar las micobacterias. Tres especies tienen una gran identidad genética con el *Mycobacterium tuberculosis*, por lo cual han sido agrupadas en el Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual incluye: *M. tuberculosis* propiamente dicho, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*. Las micobacterias patógenas no incluidas en este complejo son el *M. leprae* y las micobacterias atípicas, mejor denominadas no tuberculosas; éstas últimas se continúan clasificando según el esquema de Runyon (capacidad de formar pigmentos) propuesto desde 1952 (Tabla N°1). Muchas otras micobacterias no son

patógenas al hombre. La Tabla N°1 presenta sólo las micobacterias no tuberculosas más representativas desde el punto de vista patógeno (Torres, 1998).

Tabla N° 1.- Micobacterias Patógenas (Torres, 1998).

Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
<i>M. tuberculosis</i>	
<i>M. bovis</i> (incluido BCG*)	
<i>M. africanum</i>	
<i>M. microti</i>	
* Bacilo de Calmette- Guerin	
<i>Mycobacterium leprae</i>	
Micobacterias no tuberculosas (atípicas)	
De crecimiento lento	
No cromógenas	Complejo <i>M. avium</i>
Fotocromógenas	<i>M. kansasii</i>
Escotocromógenas	<i>M. scrofulaceum</i>
De crecimiento rápido	
<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i>	

2.3. *Mycobacterium tuberculosis*

Pertenece al phylum Actinobacteria, clase Actinobacteria, orden de los Actinomycetales, familia de las Mycobacteriaceae, género *Mycobacterium*, especie *Mycobacterium tuberculosis* (NCBI, 2008).

Es un bacilo, aerobio estricto de 0.2 a 0.6 µ por 1 a 10 µ de largo, ligeramente curvo; cuya característica distintiva, compartida con todas las micobacterias es la ácido-alcohol resistencia que consiste en retener ciertas coloraciones aun después de ser lavado con alcohol-ácido. Esta propiedad se le ha atribuido a los ácidos micólicos presentes en la pared celular (Ingraham J. L. 1998).

Asimismo, es un parásito intracelular facultativo (se desarrolla dentro y fuera de la célula del hospedador) y se transmite principalmente por las vías inhalatoria, oral, cutánea u oftálmica (Garza, 2007).

No produce toxinas y todos los factores de patogenicidad detectados hasta ahora son componentes de su pared celular: factor de cordón, sulfátidos, arabinogalactanos, lipoarabinomananos y tubérculo proteínas (De La Parte-Pérez y cols, 2001).

Con respecto a otras bacterias, *M. tuberculosis* tiene una velocidad de replicación relativamente lenta: en promedio 20 horas. Sin embargo, en condiciones de cultivo puede acortarse pero no por debajo de 8 horas (Torres, 1998).

El genoma de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) comprende 4, 411,529 pares de bases, conteniendo alrededor de 4,000 genes, además de un alto contenido de guanina-citosina (65.6%) y DNA repetitivo (particularmente secuencias de inserción). Posee una proporción relativamente alta de genes dedicados a la producción de una diversidad de enzimas involucradas en la biodegradación y biosíntesis de todos los lípidos conocidos, lo cual pone en evidencia la maquinaria que posibilita la síntesis y mantenimiento de la pared celular que protege a este microorganismo (Cole *et al*, 1998).

Con respecto a los genes involucrados en los procesos patogénicos, hasta el momento se han identificado tres genes: el **sigA** (sigma factor gene) que al mutar atenúa al bacilo, el **mcf** (macrophage- colonizing factor) que le permite invadir a los macrófagos, y el **katG** (Catalase- peroxidase) que codifica una enzima capaz de desintegrar moléculas oxidativas producidas por los fagocitos (Cole *et al*, 1998).

Presumiblemente la pared celular tiene un rol decisivo en la patogénesis, pero al ser tan compleja no resulta sencillo identificar los genes críticos que gobiernan su síntesis. Probablemente la capacidad que tiene el bacilo de degradar gran variedad de lípidos le permite no sólo mantener su pared sino, también, desintegrar membranas o vacuolas celulares de los fagocitos de su hospedador.

Sin embargo, se puede decir que la patogenicidad es multifactorial más que dependiente de una única instrucción genética (Barrera, 2000).

2.4. Patogénesis de la tuberculosis pulmonar

La infección de *M. tuberculosis* se adquiere en el hombre por vía aérea, mediante la aspiración de partículas muy finas que contienen de 1 a 3 bacilos al entrar a los espacios alveolares. Una vez que los bacilos han entrado en contacto con los alveolos pulmonares la enfermedad puede presentar **5 estadios** (Figura N°2). En el **primero** de ellos usualmente son destruidos o inhibidos por los macrófagos alveolares residentes. Si los bacilos no son destruidos, éstos eventualmente se multiplican y destruyen a los macrófagos. En el **estadio 2** aparece un estado de simbiosis, en el que el bacilo crece en forma logarítmica dentro de macrófagos inmaduros (no activados) de la lesión en desarrollo, que ya se llama tubérculo. Estos macrófagos provienen de la corriente sanguínea, estadio que se le conoce como simbiótico por dos razones, 1) los bacilos se multiplican dentro de los macrófagos sin causar un daño aparente al hospedero y 2) los macrófagos se acumulan y se dividen. En el **estadio 3** ocurre por primera vez la necrosis caseosa; el número de bacilos viables se estabiliza, porque su crecimiento es inhibido por la respuesta inmune a los antígenos parecidos a tuberculina (*tuberculin-like antigen*). En este estadio la respuesta inmune es principalmente del tipo de hipersensibilidad retardada. Los macrófagos cargados con bacilos son destruidos. La lesión ahora tiene un centro caseoso sólido, dentro del cual los bacilos, ahora libres (extracelulares), no se multiplican. Rodeando a este centro caseoso se encuentran macrófagos inmaduros (no activados) que permiten la multiplicación intracelular de los bacilos y macrófagos parcialmente activados. El **estadio 4** es el que determina si la enfermedad se hará aparente desde el punto de vista clínico. En este caso la respuesta inmune celular juega un papel determinante. Si se desarrolla una respuesta celular pobre los bacilos escapan del borde del foco caseoso y de nuevo se multiplican en macrófagos no-activados y en los parcialmente activados que se encuentran en la periferia del foco caseoso. De nuevo, los macrófagos conteniendo a los bacilos son destruidos por el sistema inmune, lo que causa el crecimiento del centro caseoso y la progresión de la enfermedad. Por otro lado, si se desarrolla una buena respuesta inmune celular el centro caseoso es rodeado por macrófagos activados, y esos macrófagos ingieren y destruyen o inactivan a los bacilos libres, lo cual detiene la evolución de la lesión, dejándola en un estado subclínico. En el **estadio 5** se observa licuefacción del centro caseoso. Este estadio ocurre cuando el bacilo evade la respuesta inmune del hospedero, y cuando esto ocurre, los bacilos se

multiplican en el medio extracelular y suelen alcanzar un enorme número. A tal grado que a pesar de que se desarrolle una adecuada respuesta inmune celular ésta no es suficiente para controlar la infección. Además, la alta concentración de productos *tuberculin-like* producidos por estos bacilos causa una respuesta del tipo de hipersensibilidad tardía que erosiona la pared bronquial y forma una cavidad. Entonces, las micobacterias invaden el árbol bronquial y se dispersan por otras partes del pulmón, tracto respiratorio inferior (TRI) y también en el medio ambiente, principalmente expeditas por la tos del paciente (Figura N°1) (Said-Fernández, 2005).

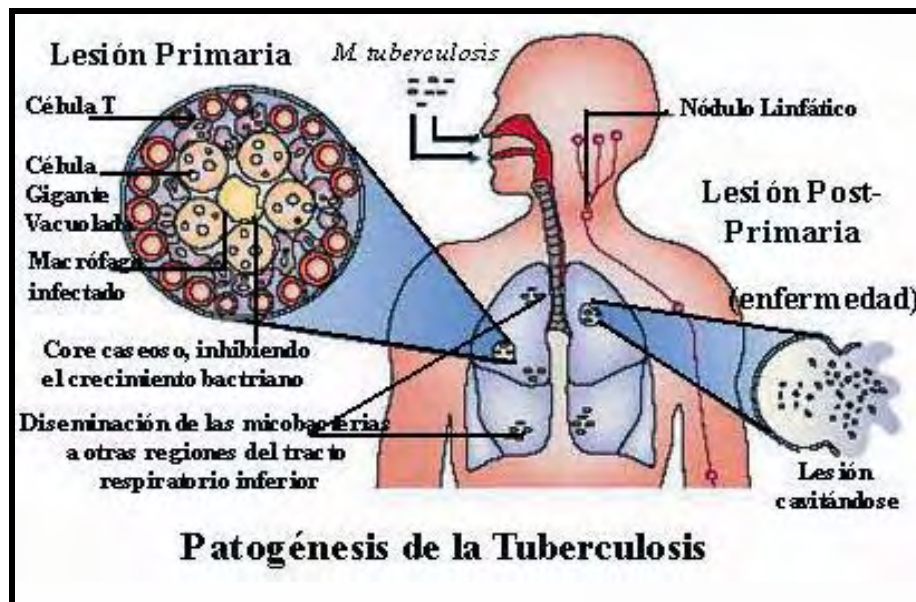


Figura N°1.-Patogénesis de la Tuberculosis.

Mycobacterium tuberculosis infecta áreas pulmonares en estadios tempranos y se disemina a lo largo del TRI conforme avanza la enfermedad (Modificado Stewart et al., 2003).

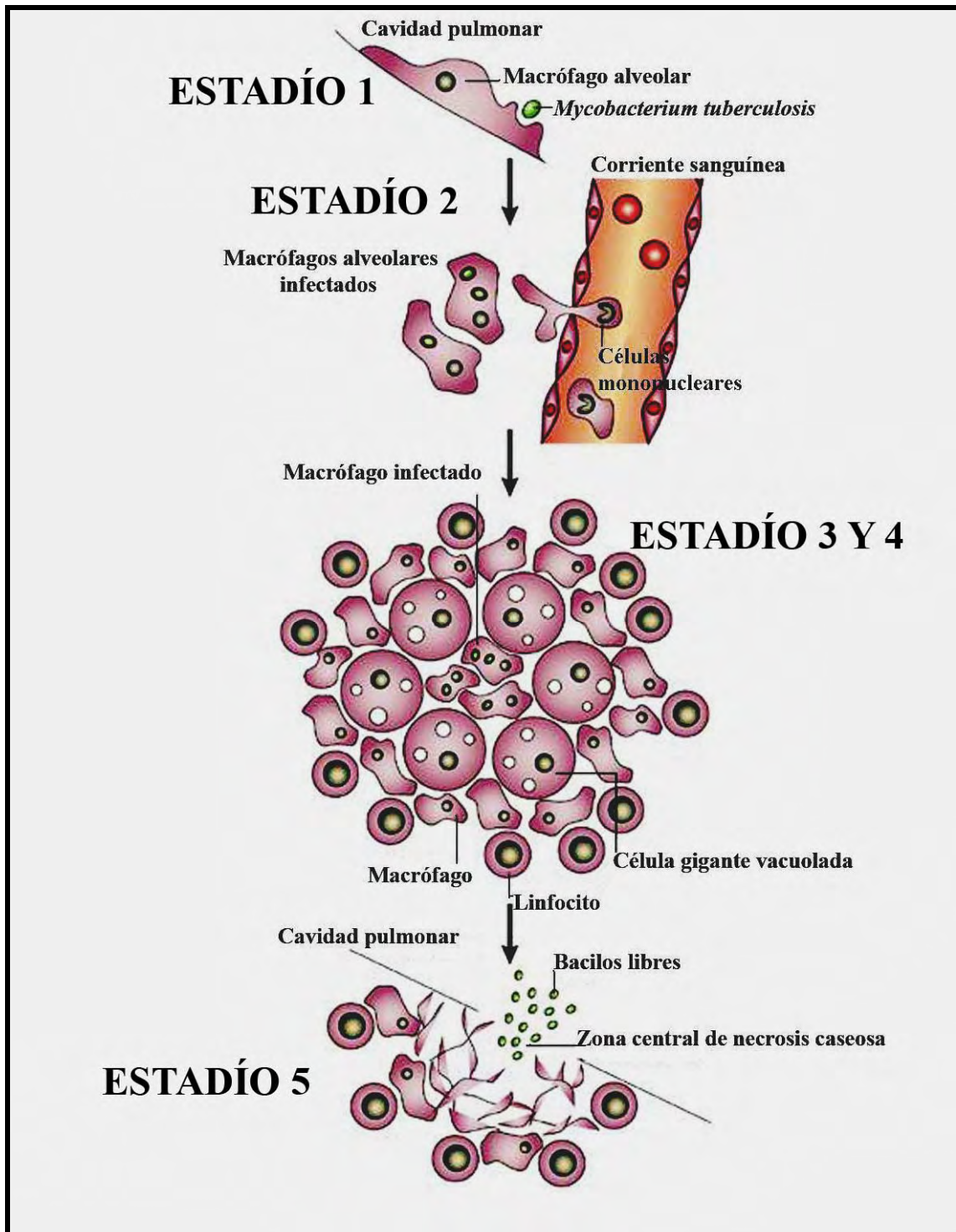


Figura N°2.- Los cinco estadios de la tuberculosis pulmonar.

Representación esquemática de los cinco estadios de la tuberculosis pulmonar causada por la infección de *Mycobacterium tuberculosis* (Modificado de Russell, 2001).

2.5. Métodos clásicos de diagnóstico de tuberculosis

El diagnóstico de la tuberculosis en el Perú, como en muchos otros países en vías de desarrollo, se basa en los hallazgos de la baciloscopía y el cultivo.

2.5.1. Baciloscopía.

En el Perú, la baciloscopía de expectoración, constituye el principal método de diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, este examen se realiza en individuos con sospecha clínica de tuberculosis, es decir, personas con tos y expectoración por más de 15 días que acuden a un centro de salud (MINSA, 2007).

El examen microscópico directo o baciloscopía consiste en la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) mediante tinciones directas. Se trata de una coloración diferencial basada en la capacidad de las micobacterias de incorporar colorantes en caliente y luego retenerlos ante la acción de una mezcla de alcohol y ácido, lo que es conocido como ácido-alcohol resistencia. En la coloración de Ziehl-Neelsen (ZN), la más empleada, las micobacterias conservan el color rojo dado por la fucsina, después de ser expuestas al alcohol-ácido. Los colorantes secundarios como el azul de metileno o el ácido pícrico de color amarillo son de contraste para resaltar el color fucsia de la micobacteria y para observar la célula y demás acompañantes de la muestra (Figura N°3).

La baciloscopía por coloración de Ziehl-Neelsen es considerada un método rápido económico y sencillo. En manos adecuadamente entrenadas posee una especificidad alta y un costo reducido por lo que constituye la principal herramienta diagnóstica en muchos países en vías de desarrollo, como el nuestro, en los que la incidencia de la enfermedad es elevada. Así mismo, la detección de bacilos ácido– alcohol resistentes en un frotis teñido constituye la primera evidencia bacteriológica de la presencia de micobacterias en caso de sospecha de tuberculosis. Sin embargo, este hecho no es considerado como sinónimo de tuberculosis ya que puede indicar, además de la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*, la de micobacterias no tuberculosas e incluso

la de otros microorganismos con propiedades tintoriales de ácido-resistencia, como *Nocardia spp* (Laniado y cols, 2005) .

Por tanto, la sensibilidad de la baciloscopía es limitada, variando entre 30 y 80% dependiendo tanto del tipo de muestra, métodos de recuperación utilizados así como, de la población analizada (Morán y cols, 2000).

Según la OPS (Organización Panamericana de la Salud) para que la baciloscopía sea positiva es preciso que la muestra tenga como mínimo entre 5,000 y 10,000 bacilos por mililitro de muestra (OPS, 2008), aunque otros autores consideran un límite de detección más amplio, entre 1,000 y 10,000 bacilos por mililitro de muestra (Morán y cols, 2000; Nava y cols, 2005). Cabe resaltar que este alto contenido de bacilos se encuentra principalmente en pacientes con tuberculosis pulmonar avanzada.



**Figura N° 3.- Identificación de Bacilos Ácido-Alcohol Resistentes (BAAR).
mediante Baciloscopía.**

Coloración de Ziehl-Neelsen muestra varios BAAR teñidos de color rojo 100X
(Core Curriculum on Tuberculosis, 2000)

2.5.2. Cultivo

Este método nos permite establecer el diagnóstico definitivo de tuberculosis mediante el hallazgo e identificación de bacilos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Las muestras empleadas para este tipo de análisis son principalmente las procedentes del tracto respiratorio. Sin embargo para muestras extrapulmonares tales como: orina, lavado gástrico, líquido céfalo raquídeo (LCR), biopsias ganglionares, etc., el cultivo constituye el único método de diagnóstico, debido al bajo número de bacilos por mililitro de muestra.

En su mayor parte, las micobacterias presentan unos requerimientos nutritivos relativamente sencillos. Por lo que suelen crecer en medios de cultivos que contienen glicerol o acetato como única fuente de carbono y sal de amonio como fuente de nitrógeno. El crecimiento de *M. tuberculosis* es estimulado por lípidos y ácidos grasos, debido a ello suele añadirse a los cultivos yema de huevo (una buena fuente de lípidos) para conseguir un crecimiento mucho mayor (Madigan, 1999).

Los cultivos pueden realizarse en medios sólidos como el de **Löwenstein-Jensen** (Figura N°4) y el de **Ogawa**, en los cuales el crecimiento suele tardar entre 3 y 8 semanas, ó en medios líquidos como el de **Middlebrook** en el que el crecimiento de la bacteria suele ser más rápido permitiendo obtener resultados positivos en 2-3 semanas, sin embargo no se dan por negativos hasta transcurridas 6 semanas.

Desde hace algunos años se viene implementando otros sistemas de cultivo con el objetivo de disminuir el tiempo de proceso, la mayoría en medios líquidos tales como: el sistema **Bactec TB**, el tubo indicador de crecimiento micobacteriano “**MGIT**”, el sistema **MB-check** y el medio de cultivo **ESP II**. De ellos el más conocido es el sistema **Bactec TB**, el cual es un medio líquido enriquecido con una fuente de carbono radiactivo que disminuye, aproximadamente, a la mitad el tiempo de recuperación. Sin embargo, este sistema, presenta desventajas importantes tales como el costo del equipo, los reactivos, el uso de radioactividad y su desecho (Ponce de León, 2007).

El cultivo tiene mayor sensibilidad que la baciloscopía, variando esta entre 70 y 90%. La OPS señala que el cultivo puede evidenciar un mínimo de 10 a 100 BAAR presentes en una muestra si es realizado en forma adecuada (OPS, 2008), coincidiendo de esta

manera con otros autores que señalan que para el desarrollo de por lo menos una colonia en el medio de cultivo, la muestra debe contener más de 10 bacilos vivos por mililitro de muestra (Nava y cols, 2005).

Sin embargo, a pesar de la variedad de estrategias disponibles en la actualidad para realizar el cultivo, este aún adolece de limitaciones, siendo la más importante su escasa utilidad en el diagnóstico rápido y oportuno, así como también su baja sensibilidad cuando se analizan muestras biológicas que contienen un pequeño número de microorganismos (< de 10 bacilos por mililitro de muestra) (Morán y cols, 2000; Nava y cols, 2005).

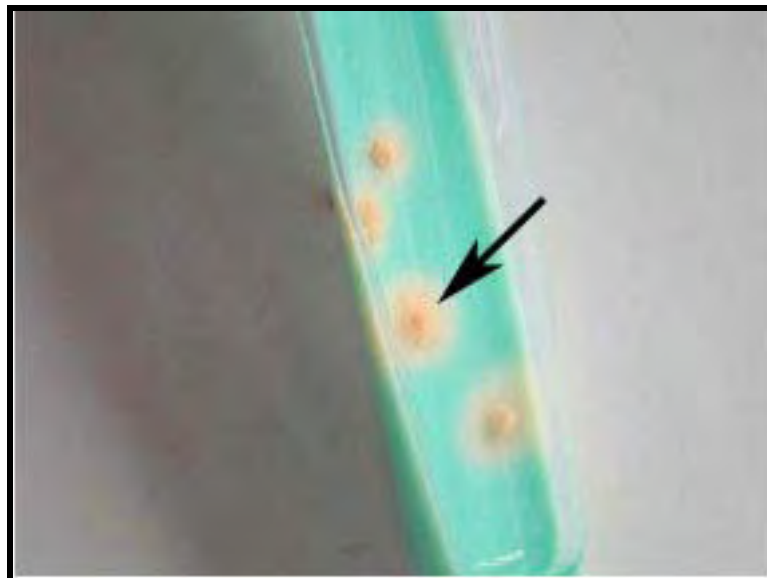


Figura N° 4.- Identificación de *Mycobacterium tuberculosis* mediante cultivo.

**Colonias de *Mycobacterium tuberculosis* en medio de cultivo de Löwenstein Jensen
(Palomino et al 2007).**

2.6. Detección molecular de *Mycobacterium tuberculosis*

El diagnóstico clásico de la tuberculosis se ha basado en la baciloscopía y el cultivo. Sin embargo éstos poseen aún limitaciones importantes, tales como la baja sensibilidad y escasa utilidad en el diagnóstico rápido, respectivamente. Debido a ello, y a la alta frecuencia de esta enfermedad en nuestro país, se ha creado la necesidad de implementar nuevas estrategias basadas en métodos rápidos, sensibles y específicos.

Un gran avance en este campo es la incorporación de métodos de la biología molecular, en particular los basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en el diagnóstico confirmatorio de la tuberculosis. Estos métodos ofrecen la posibilidad de identificar de manera precisa a una gran diversidad de microorganismos, entre ellos las micobacterias, mediante el uso de cebadores o *primers* para PCR dirigidos contra secuencias genómicas específicas de género y especie.

La detección de material genético específico de *Mycobacterium tuberculosis* suele realizarse a partir de muestras biológicas o de cultivo, permitiendo establecer el diagnóstico en 1-3 días, en lugar de las 2- 4 semanas del cultivo. Dicha detección es posible independientemente de la viabilidad de la bacteria (Ver Tabla N°2) y del tamaño de la muestra.

Tabla N°2.- Características De Los Principales Métodos De Diagnóstico De Tuberculosis.

Prueba	Tiempo requerido	Principales inconvenientes	Valor Diagnóstico
Baciloscopía.	3 días (3muestras).	Baja sensibilidad	No
Cultivo.	3 - 8 semanas.	El tiempo que requiere.	Sí
PCR.	1 - 3 días.	Costo elevado	Sí

(Modificado Palma-Nicolás y cols, 2007)

A nivel mundial, varios grupos de investigación han propuesto y utilizado diferentes dianas génicas (IS6110, 32kDa, 65kDa, etc.), y en ellas distintos fragmentos, para la detección de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR (Baldeviano y cols, 2003; Laniado y cols, 2001; Miyazaki et al, 1993; Pierre et al, 1991; Santillán, 2002; Nava y cols, 2005; Barrón y cols, 2006).

En el 2004, Morishi et al, analizaron diferentes *primers* (para las secuencias génicas: IS6110, 65kDa, 38kDa y MPB64) utilizados en el diagnóstico de tuberculosis mediante PCR, los resultados obtenidos demostraron que todas las secuencias génicas analizadas fueron encontradas en todas las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de la población estudiada (Amazonas, Brasil). Además, demostraron que la amplificación de la secuencia génica 65kDa mediante *PCR-Nested* presenta una concordancia observada de 88,9%, co-positividad de 84,2% y co-negatividad de 100% con el cultivo en el medio sólido Löwenstein-Jensen.

Por otra parte, nuestro país no es ajeno a este tipo de investigaciones y desde hace varios años se vienen desarrollando estudios al nivel de biología molecular para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* en distintas muestras biológicas, así como detección de genes asociados a resistencia a drogas. Así, en el año 2001, Salazar et al reportaron una variante de la PCR, PCR-Heminested, como criterio diagnóstico de tuberculosis pulmonar en niños obteniendo resultados positivos en el 76% de los individuos con diagnóstico definitivo de tuberculosis, 18% en individuos con un diagnóstico probable y 27% en individuos con diagnóstico negativo.

En el año 2002, Santillán determinó la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la PCR en el diagnóstico de la tuberculosis pleural en un grupo de pacientes limeños con sospecha clínica de esta patología. Este trabajo determinó que la prueba de la PCR es más específica (100%) y rápida, con respecto a la histopatología y el cultivo (75%), lo cual le otorga utilidad diagnóstica.

En el 2003, Calderón y cols, emplearon el método de la PCR para la detección rápida de resistencia a drogas en pacientes con tuberculosis pulmonar, encontrando una concordancia general entre la detección molecular y convencional de la susceptibilidad a rifampicina e isoniacida de 96.7% y 83.9% respectivamente. Así mismo Agapito y

cols en el 2002, realizaron la caracterización de las mutaciones en el gen *rpoβ* asociadas a la resistencia a rifampicina mediante PCR, clonación y secuenciación, en pacientes con tuberculosis pulmonar encontrando en casi todas las cepas resistentes a rifampicina mutaciones en el gen *rpoβ* y resistencia a isoniazida.

Otros investigadores, como Baldeviano y cols, (2003), emplearon el método de la PCR para determinar perfiles genéticos (RFLP IS6110) de pacientes con tuberculosis pulmonar, encontrando como resultado un total de 50 perfiles de 70 pacientes analizados y genotipos asociados a resistencia.

En el año 2006, Barrón y cols demostraron la utilidad de la PCR en el diagnóstico de tuberculosis pleural a partir de muestras histológicas embebidas en parafina. Asimismo determinaron su sensibilidad frente a la tinción con fluorocromo-auramina. Los resultados de este trabajo demostraron que la prueba de la PCR posee una sensibilidad de 96,7%, un valor predictivo positivo de 100% y un valor predictivo negativo de 94,7%; mientras que la prueba de tinción con fluorocromo-auramina posee 58,6%, 100% y 56,7%, respectivamente. Lo cual demostró que la prueba de la PCR es un método muy sensible en el diagnóstico de tuberculosis en muestras histológicas embebidas en parafina.

En cuanto a trabajos hechos en el extranjero, Sjöbring *et al* (1990), publicaron uno de los primeros trabajos de detección de especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR, sus resultados sugirieron que la amplificación por PCR tiene un límite de detección menor a 10 células bacterianas por mililitro, lo cual le otorga una mayor sensibilidad que el cultivo y sugiere que este método puede ser aplicado a muestras clínicas para un rápido y específico diagnóstico de tuberculosis.

Más recientemente, Morán y cols, (2000), compararon la detección de *Mycobacterium tuberculosis*, en muestras biológicas, mediante baciloscopía, cultivo y PCR. Los resultados de este trabajo demostraron que la prueba del PCR posee una sensibilidad de 92,3%, una especificidad de 78,7%, un valor predictivo positivo de 20,3% y un valor predictivo negativo de 99,4% con respecto al cultivo.

Resultados similares fueron los obtenidos por Nava y cols, (2005), los cuales evaluaron la utilidad diagnóstica de la baciloscopía, cultivo y PCR en muestras de esputo. Ellos demostraron que la PCR es mucho más sensible (100%) que los procedimientos bacteriológicos de rutina (baciloscopía y cultivo), sugiriendo que esta prueba es una herramienta muy poderosa para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar y otras enfermedades micobacterianas.

Por otra parte, Miyazaki *et al*, (1993), demostraron que el empleo de protocolos de reamplificación, como el *PCR-Nested*, incrementa la sensibilidad de detección de *Mycobacterium tuberculosis* con respecto a una sola reacción de PCR hasta 1000 veces en base al conteo bacteriano y cantidad de DNA.

2.7. Muestras Biológicas Procedentes Del Tracto Respiratorio Inferior (TRI).

2.7.1. Tracto Respiratorio Inferior

El Tracto Respiratorio Inferior (TRI) es una división del sistema respiratorio que comprende la laringe (órgano vocal), la tráquea, los bronquios y los alvéolos (Figura N°5). Los alvéolos son los sacos aéreos que constituyen el tejido pulmonar; en ellos se intercambia oxígeno y dióxido de carbono entre los pulmones y la sangre. La *pleura* es una membrana de dos capas que rodea a los pulmones. Una mucosa ciliada recubre el sistema respiratorio inferior hasta los más finos bronquiolos y ayuda a evitar que los microorganismos alcancen los pulmones. Si los microorganismos alcanzan los pulmones la mayoría suelen ser localizados, ingeridos y destruidos por los macrófagos alveolares. Los anticuerpos de la clase IgA, presentes en secreciones como la mucosidad de las vías respiratorias, la saliva y las lágrimas, contribuyen también a proteger las mucosas del sistema respiratorio de muchos patógenos. Por lo tanto el organismo posee varios mecanismos para eliminar a los patógenos que producen infecciones de transmisión aérea. Si fallan todos estos mecanismos el microorganismo gana en la competencia hospedero-parásito y se desencadena una enfermedad respiratoria (Clínica Universidad de Navarra, 2008).

Como cualquier enfermedad infecciosa, el diagnóstico de la tuberculosis se inicia con una alta sospecha clínica que permite iniciar una serie de pruebas complementarias, que van desde la baciloscopía la amplificación por PCR, hasta llegar al diagnóstico final. Por lo

tanto, el tipo y la calidad de la muestra biológica que se remite al laboratorio para su análisis es crucial en la identificación del agente etiológico de esta enfermedad como lo es el *Mycobacterium tuberculosis*.

El material biológico procedente del TRI es estéril en condiciones normales, sin embargo, suele contaminarse con microorganismos que habitan el tracto respiratorio superior (boca y faringe). Por ello, es necesario obtener las muestras directamente desde el sitio de la lesión (Clínica Universidad de Navarra, 2008).

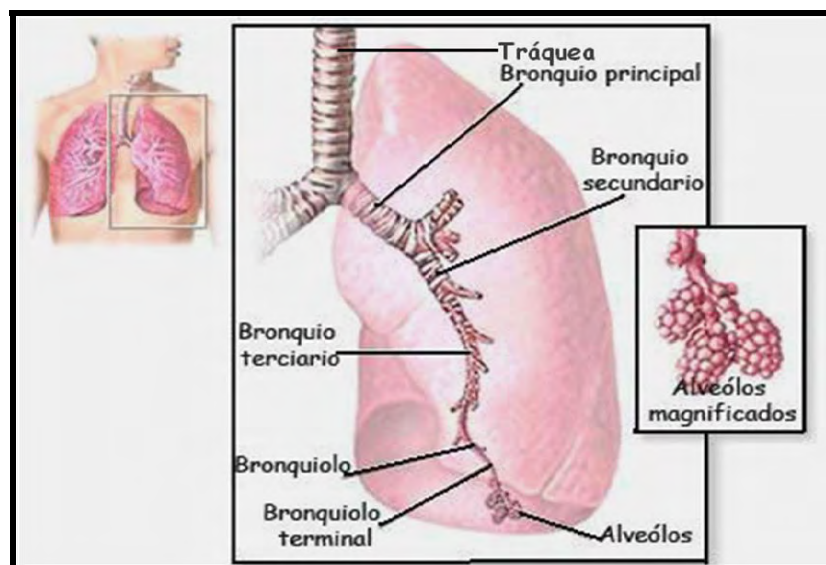


Figura N° 5.-Tracto Respiratorio Inferior

Vista interna de las regiones del TRI dentro de los pulmones.

(http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/19379.htm)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

3.1.1. Material biológico:

43 muestras biológicas del Tracto Respiratorio Inferior (TRI) fueron obtenidas a través de los siguientes procedimientos: lavado bronquial, aspirado bronquial, secreción bronquial, lavado bronco-alveolar, aspirado bronco-alveolar y broncofibroscopía, en un volumen de 20 ml de buffer fosfato salino (PBS) pH 7.3. Las muestras correspondían a pacientes limeños con sospecha clínica de tuberculosis procesadas en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular Oncológico “MAMLAB” durante el período Agosto 2006 - Febrero 2007.

3.1.2. Material de laboratorio:

Reactivos:

- Agua grado molecular
- Buffer PCR 10X (Applied Biosystem).
- Enzima Taq DNA polimerasa (Applied Biosystem Biosystem).
- Solución de Cloruro de Magnesio (Applied Biosystem Biosystem).
- Solución DNTP'S (Farmacia).
- Buffer PBS pH 7.0
- Buffer TNE pH 8
- Cloruro de Sodio (Sigma)
- Tris-Base(Sigma)
- EDTA (Sigma).
- Proteínasa K (Sigma).
- SDS (Sigma).
- Cloroformo (Riedel de Haën).
- Alcohol isoamílico (Riedel de Haën).
- Fenol saturado y redistilado (Sigma).
- Etanol absoluto (Riedel de Haën).

- Acetato de sodio (Sigma).
- Azul de bromofenol (Sigma)
- Ficoll (Sigma)
- Tris-Base (Sigma)
- Ácido acético glacial (Riedel deHaën)
- Bromuro de Etidio (Sigma).
- Agarosa (Maxim).
- Marcador de peso molecular X174 ϕ (Gibco).

Material descartable:

- Tubos de 50ml (Falcon).
- Tubos de 1.5ml (Eppendorf).
- Tubos de 0.2 μ l (Eppendorf).
- Puntas de plástico de 0.5-10 μ l (Axigen).
- Puntas de plástico de 10-100 μ l (Axigen).
- Puntas de plástico de 100-1000 μ l (Axigen).
- Pipetas de transferencia de 3ml (Sigma).
- Pipetas Pasteur (Chase Instrumens).
- Parafilm (American National Can).
- Piscetas de plástico 250ml (Nalgon).
- Papel toalla.
- Papel higiénico (Silky).

Equipos de laboratorio:

- Micropipeta rango variable 0.5- 10 μ l (Oxford).
- Micropipeta rango variable 10- 100 μ l (Oxford).
- Micropipeta rango variable 100- 1000 μ l (Oxford).
- Centrífuga para tubos de 15 y 50 ml, rango: 100-3200 rpm, (Celm).
- Centrífuga para tubos de 0.2 μ l –1.5 ml, rango de 6000-10000 rpm (Clinica's).
- Baño María rango de temperatura: 30-110°C (Clinica's).
- Congeladora –36°C (Ferro Bras).

- Refrigeradora -4°C (Mabe).
- Termociclador 2400 (Applied Biosystems).
- Cámara de electroforesis horizontal (Fisher).
- Transiluminador de luz Ultravioleta (UV).
- Fuente de poder (Fisher).
- Horno Microondas (Mirray).
- Balanza analítica (LT).
- Horno eléctrico (Imaco).
- Sistema de Foto documentación (Kodak Easy Share P850).
- Espectrofotómetro (Shimadzu).

Material de bioseguridad:

- Mascarillas de protección para *M. tuberculosis* N95 (Descarpack).
- Gorros (Sunwell).
- Cubre calzados (Sunwell).
- Guantes (Super Max).
- Lentes.
- Hipoclorito de sodio.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Obtención del material biológico.-

Se utilizaron 7 métodos de obtención del material biológico procedente del TRI (Ferrán, 2001) los cuales fueron:

A. Aspirado bronquial.- Consiste en la aspiración mediante el broncofibroscopio de las secreciones del árbol bronquial, generalmente tras la instilación de 3-5 ml de suero fisiológico. La muestra obtenida procede del árbol bronquial superior y no es representativa del territorio alveolar ni bronco-alveolar.

B. Lavado bronquial.- Se procede de la misma manera que en el aspirado bronquial, pero se incrementa la cantidad de suero fisiológico instilado, siendo

aproximadamente de 20 a 50 ml. La muestra obtenida procede del árbol bronquial superior y no es representativa del territorio alveolar ni bronco-alveolar.

C. Secreción bronquial.- Este material biológico es obtenido a partir del árbol bronquial.

D. Lavado bronco-alveolar (LBA).- Consiste en la instilación a través del broncofibroscopio de un volumen determinado de suero fisiológico (en general entre 120 y 200 ml) a nivel de un segmento o subsegmento pulmonar. Cada instilación se sigue inmediatamente de una aspiración, tratando de conseguir la máxima cantidad de fluido instilado (30-70%). La muestra obtenida representa las secreciones presentes en aproximadamente un millón de alveolos y sus correspondientes bronquiolos (1% de la superficie pulmonar), estimándose que en el líquido recuperado se encuentra diluido 1 ml de secreción.

E. Aspirado bronco-alveolar.- Se procede de la misma manera que el LBA, pero se disminuye la cantidad de suero fisiológico instilado (3-5ml) previo a la aspiración. La muestra obtenida suele ser de consistencia más densa que el LBA.

F. Broncofibroscopía.- Este método nos permite obtener material biológico del árbol traqueo-bronquial mediante un broncoscopio de fibra óptica.

G. Aspirado pulmonar.- Mediante este procedimiento se recoge el exudado de las lesiones pulmonares por aspiración. aunque es una muestra con una especificidad muy alta no está libre de complicaciones (hemorragia) y contraindicaciones.

3.2.2. Transporte y conservación de las muestras

Las muestras deben trasladarse al laboratorio en contenedores estériles, perfectamente cerrados y en un plazo máximo de 2 horas desde su colección. Los lavados bronquiales y bronco-alveolares se recogen en frascos de boca ancha con cierre hermético, preferiblemente de tapa rosca. Los productos de aspiración y secreción (diluidas en 1ml de suero fisiológico) se depositan en tubos estériles con tapa rosca.

Las muestras deben procesarse lo más rápidamente posible, pero si el procesamiento va a demorar varias horas, es preferible conservarlas a 4 ° C.

3.2.3. Método experimental.-

Se basó en el aislamiento y purificación del material genético, DNA, del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, amplificación de la secuencia génica mediante PCR-*Nested* y electroforesis en geles de agarosa de los productos amplificados (MAMLAB, 2007).

3.2.3.1. Aislamiento y purificación del material genético, DNA, de *Mycobacterium tuberculosis* a partir del material biológico.

El aislamiento y purificación del DNA se llevó a cabo en tres etapas: digestión celular, extracción orgánica y precipitación del DNA.

A. Digestión Celular

Permite la disgregación de la estructura tisular y celular, para facilitar la salida del DNA, para ello, las muestras biológicas del TRI son centrifugadas y el precipitado celular obtenido es resuspendido en un buffer adecuado para su digestión (TNE), conteniendo un agente quelante (EDTA) para inhibir las DNAsas, un detergente (SDS 10%), para disolver los lípidos de las membranas celulares y liberar al DNA de proteínas básicas como las histonas, y proteinasa K (20mg/ml) para digerir las proteínas.

B. Extracción orgánica

Permite la eliminación progresiva de proteínas y otros contaminantes celulares, y la obtención de un material genético cada vez más limpio. En esta etapa se adiciona fenol redistilado y saturado (pH 8) y una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24/1) para separar el DNA libre en el medio acuoso del resto del material orgánico, además de desnaturalizar proteínas y disolver lípidos respectivamente. Durante la centrifugación se observa la formación de dos fases: acuosa y orgánica, el DNA por ser hidrofílico se

orienta hacia la fase acuosa que contiene el buffer, y el resto del material orgánico se disuelve en el fenol y la mezcla cloroformo/alcohol isoamílico donde queda atrapado, debido a ello a esta etapa se le denomina extracción orgánica, este paso implica dos repeticiones.

C. Precipitación del DNA

Permite la obtención de DNA listo para ser almacenado o diluido en la concentración deseada para su análisis. Se basa en la formación de un precipitado de DNA con alcohol absoluto (etanol) en medio salino (acetato de sodio) favoreciendo de esta forma la deshidratación del DNA, además opcionalmente se somete a temperaturas frías de hasta -80°C para garantizar la precipitación.

- 1) Se trasvasó la muestra a un tubo Falcon estéril y se añadió solución salina fisiológica hasta alcanzar un volumen de 50ml. Se centrifugó durante 15 – 20 minutos hasta obtener un precipitado de células.
- 2) Se desechó el sobrenadante sin tocar el botón celular. Se agregó buffer TNE (pH 8), se homogenizó y trasvasó a un tubo eppendorf estéril. de 1.5 ml.
- 3) Se agregó SDS al 10% y proteinasa K e incubó en baño maría a 65°C, por 1 hora.
- 4) Se agregó fenol saturado y re destilado (pH 8.0) y una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24/1). Se agitó manualmente durante 5 minutos.
- 5) Se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se evidenció las dos fases: acuosa y orgánica.
- 6) Se tomó con una pipeta Pasteur la fase acuosa y trasvasó a otro tubo estéril. Se descartó la fase orgánica.
- 7) Se adicionó nuevamente la mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24/1) y se agitó durante 5 minutos.
- 8) Se repitieron los pasos 5 y 6.
- 9) Se adicionó acetato de sodio 3M (pH 5.2) y etanol absoluto. Se dejó precipitar a -36°C durante toda la noche.
- 10) Se centrifugó a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar con parafilm agujereado a temperatura ambiente durante 15-20 minutos.

11) Se resuspendió en agua desionizada y almacenó en el banco de ADN a -36°C, para su posterior utilización.

3.2.3.2. Determinación de la concentración de DNA extraído por Espectrofotometría (Sambrook *et al* , 1989).

A. Para la muestra blanco:

Se agregó 100ul de agua desionizada a un tubo de microcentrifuga.

B. Para las muestras pruebas:

Se agregó 99ul de agua desionizada+ 1ul de DNA extraído a un tubo de microcentrífuga.

Nota: la lectura se realizó por espectrofotometría a 260nm de longitud de onda. Se consideró que una unidad de absorbancia a 260nm de dsDNA es igual a 50ug/ml de dsDNA.

3.2.3.3. Amplificación de la secuencia génica mediante *PCR-Nested*

La PCR se desarrolla normalmente en tres pasos (Figura N°6):

- **Desnaturalización:** esta fase se realiza a 94°C y consiste en la separación de la doble cadena de DNA.

- **Hibridación:** fase en la que los cebadores se unen a su molde. La temperatura de hibridación es específica de cada fragmento y de los cebadores empleados.

- **Extensión:** esta fase se realiza a 72°C y en ella la enzima DNA polimerasa incorpora los desoxinucleótidos disponibles en el medio y extiende la hebra que se está sintetizando.

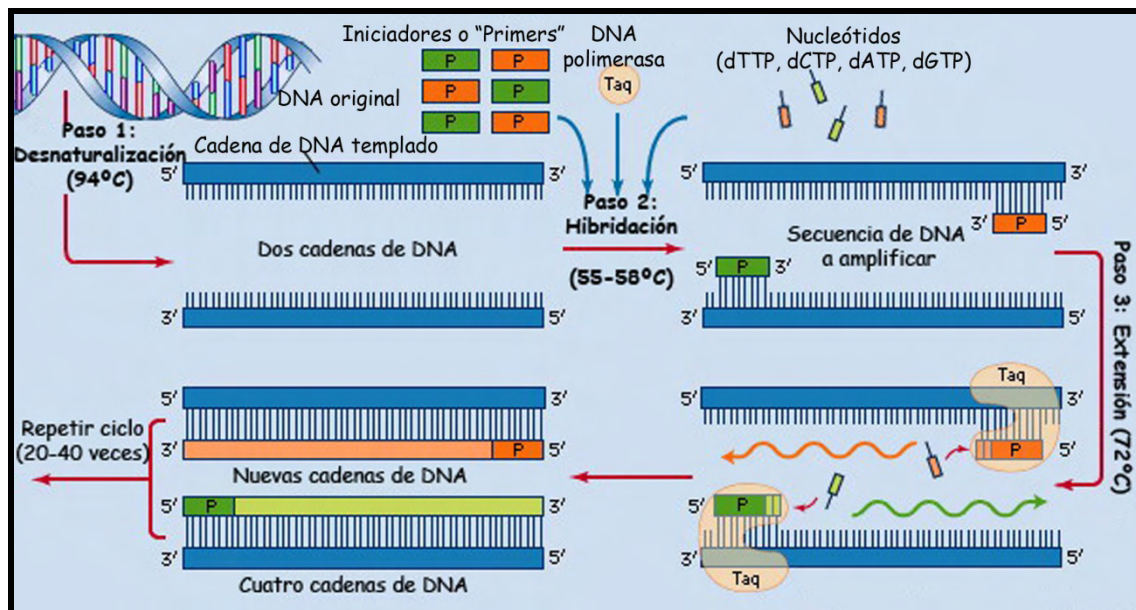


Figura N° 6.- Amplificación genética mediante PCR

Representación esquemática de los tres pasos de la PCR: Desnaturalización, Hibridación y Extensión (*Enciclopedia Británica Inc., 1998*).

Hoy en día existen variantes de la PCR mucho más sensibles, específicas y prácticas como la *PCR- Nested* o segundo PCR. Este método consiste en dos reacciones de PCR consecutivas, con dos pares de cebadores distintos. En la primera reacción de amplificación se utilizan cebadores específicos (externos) de la secuencia por analizar. El producto de esta reacción sirve como templado para una segunda reacción de PCR, en la cual se pretende amplificar un fragmento de la secuencia amplificada en el primer PCR. En este caso el segundo juego de cebadores (internos) se aparea a una secuencia limitada por el primer juego de cebadores (externos). La sensibilidad en la detección se ve aumentada ya que al final del ensayo la secuencia blanco ha sido amplificada a lo largo de dos rondas de PCR. La *PCR- Nested* es una variante muy usada sobretodo cuando se tienen pequeñas cantidades del DNA de interés (<10 bacilos por mililitro de muestra), cuando se quieren evitar las amplificaciones inespecíficas o incrementar la sensibilidad de detección de una secuencia génica (Loera-Castañeda, 2003).

Además, si el producto de la primera reacción de PCR es el resultado de una amplificación inespecífica, el segundo par de cebadores internos no los reconocerá y por consiguiente no habrá amplificación (Pierre *et al*, 1991).

Para realizar el presente trabajo se emplearon cebadores específicos externos e internos para la amplificación de DNA de especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Los cebadores usados en este trabajo, **MTB1001** y **MTB1003** (Tabla N°3 y N°4 respectivamente), fueron descritos por Shinnick (1987) y amplifican una región de la secuencia génica de la proteína A (65KDa) de la pared celular de especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* que se mantiene estable en las diferentes muestras biológicas (Figura N° 7).

Los productos de amplificación de la PCR son de 164 y 116 pares de bases, respectivamente.

Tabla N°3.- Secuencia de los Cebadores externos usados en la PCR - First
(Shinnick, 1987).

MTB1001 (sentido) 5' -CCCGTCGTCGCAGCGAGTGG -3'
MTB1001 (antisentido) 3' -CGGGGATGAAACGGGGGTCA-5'

Tabla N°4.- Secuencia de los Cebadores internos usados en la PCR - Nested
(Shinnick, 1987).

MTB1003 (sentido) 5' -CTAGGTCGGGACGGTGAGGCCAGG
MTB1003 (antisentido) 3' -CATTGCGAAGTGATTCCTCCGGAT

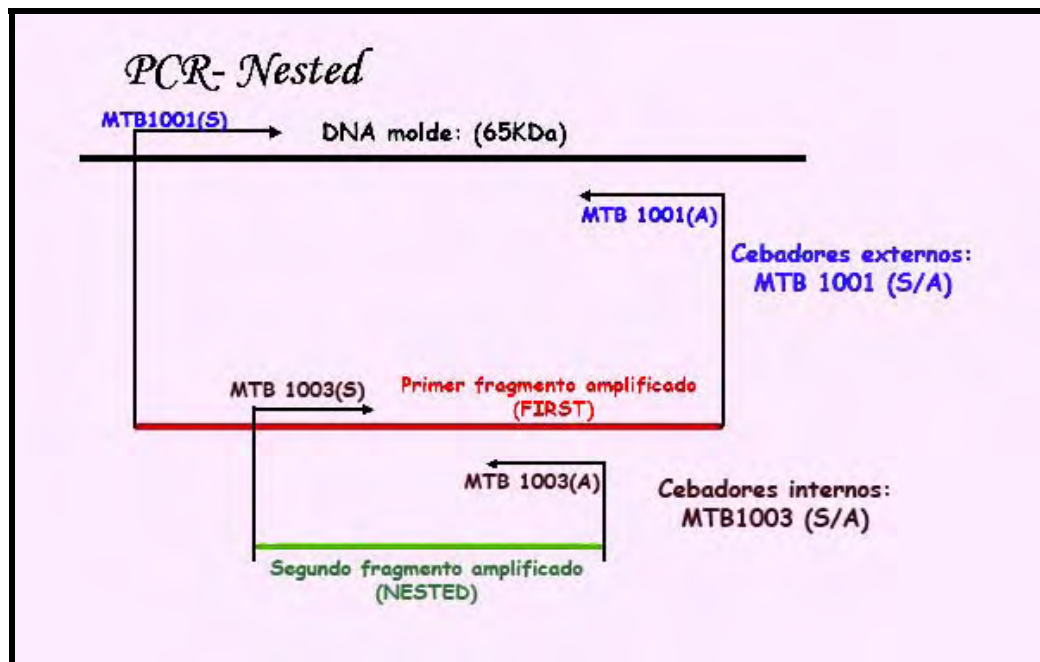


Figura N° 7.- PCR-Nested.

Representación esquemática de una *PCR-Nested*; los cebadores MTB1003(S/A) están diseñados para hibridar con una secuencia interna del primer producto de amplificación.

- 1) Se preparó una mezcla de reacción conteniendo agua grado molecular, buffer PCR 10X, desoxinucleótidos trifosfato “dNTPs”, cloruro de magnesio 25mM, cebadores externos “**MTB1001**” (10uM) sentido y antisentido, Amplitaq Gold (5U/ul) y 5µl de muestra de DNA en un tubo eppendorf de 0.2ml. Adicionalmente se usaron para cada muestra controles positivos y negativos. Como control positivo se empleó DNA extraído de cultivo sólido, medio Löwenstein-Jensen en el que había crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* y como control negativo se usó DNA extraído de micobacterias no tuberculosas.
- 2) Se colocaron los tubos en un termociclador 2400 (Applied Biosystem) con el siguiente programa:

Tabla N° 5.- Programa *PCR-First*

Ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1 ciclo	96°C	1 minuto
35 ciclos	94°C	1 minuto
	58°C	1 minuto
	72°C	1 minuto
1 ciclo	72°C	10 minutos
	4°C	α

Para la segunda reacción de PCR:

- 3) En un tubo nuevo estéril, se preparó la misma mezcla de reacción del paso 1 pero empleando como cebadores internos “**MTB1003**” sentido y antisentido.
- 4) Se colocó como DNA blanco 5µl de producto amplificado en el primer PCR.
- 5) Se colocaron los tubos en un termociclador 2400 (Applied Biosystem) con el siguiente programa:

Tabla N°6.- Programa *PCR-Nested*

Ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1 ciclo	96°C	1 minuto
30 ciclos	94°C	1 minuto
	55°C	1 minuto
	72°C	1 minuto
1 ciclo	72°C	10 minutos
	4°C	α

3.2.3.4. Electroforesis en geles de agarosa de los productos amplificados.

- 1) Se licuó la agarosa (3%) y posteriormente se enfrió al ambiente hasta que alcanzó una temperatura de 50-60°C.
- 2) Se tomó con una pipeta un volumen de gel y se trasvasó a un vaso precipitado.

- 3) Se adicionó bromuro de etidio al gel y se homogenizó.
- 4) Se trasvasó el gel del vaso precipitado hacia el recipiente porta gel, se insertó el peine para formar los pozos y se dejó enfriar durante 30 minutos.
- 5) Se sumergió el gel en la cámara de electroforesis conteniendo el buffer de corrida TAE 50X.
- 6) Se mezcló el producto amplificado con el buffer de carga, en una proporción de 4 a 1. Se colocaron las muestras en el gel.
- 7) Se colocó el marcador de peso molecular (X174 ϕ).
- 8) Se cubrió la cámara de electroforesis con la tapa y se conectaron los cables correspondientes de los electrodos en la fuente de poder.
- 9) Se encendió la fuente de poder y se procedió a seleccionar el voltaje adecuado (100V).
- 10) Se calibró el tiempo de electroforesis (40 minutos).
- 11) Finalizada la electroforesis se procedió al desmontaje del equipo.

3.2.3.5. Detección de los productos por Tinción con Bromuro de Etidio.

- 1) Se retiró el gel de la cámara, se sumergió en un recipiente de plástico conteniendo buffer TAE50X con bromuro de etidio y se incubó durante 10 minutos.
- 2) Se trasladó el gel hacia el transiluminador y se lo depositó cuidadosamente sobre la pantalla.
- 3) Se visualizó el DNA usando lentes protectores contra la luz UV.
- 4) Se identificaron las bandas y se tomaron las fotos correspondientes.

3.2.4. Método de análisis.-

Para la evaluación, se tomaron en cuenta seis parámetros: Procedencia de las muestras biológicas, presencia de contaminantes (restos de sangre) en éstas, presencia de las bandas correspondientes a los productos amplificados en el primer y segundo evento (164pb y 116pb, respectivamente), intensidad de las bandas, así como también la sensibilidad y especificidad de los dos eventos de amplificación.

3.2.4.1. Procedencia de las muestras biológicas

Las muestras biológicas del Tracto Respiratorio Inferior (TRI) fueron obtenidas a través de los siguientes procedimientos: lavado bronquial, aspirado bronquial, secreción bronquial, lavado broncoalveolar, aspirado broncoalveolar y broncofibroscopía.

3.2.4.2. Presencia de contaminantes en las muestras biológicas

La presencia de contaminantes en las muestras biológicas estuvo determinada por la visualización de restos de sangre. Asimismo la calidad de las muestras se evaluó de acuerdo al **score** planteado para el estudio:

Calidad De Las Muestras	Presencia De Contaminantes
Muy buena	–
Buena	+
Regular	++
Mala	+++

3.2.4.3. Expresión de la secuencia génica de la proteína A (65KDa) de *Mycobacterium tuberculosis* en el primer y segundo evento de amplificación

Las moléculas de DNA fueron visualizadas al ser coloreadas con bromuro de etidio, ya que fluorecieron como bandas de color naranja frente a la luz UV. Así mismo, se determinó el peso molecular de los productos amplificados usando el marcador de peso molecular X174 ϕ (Gibco), el cual al ser comparado con la muestra problema nos permitió determinar de manera aproximada el número de pares de bases de cada uno de ellos.

Por lo antes expuesto, la expresión de la secuencia génica de la proteína A (65KDa) de *Mycobacterium tuberculosis* fue detectada por la presencia de las bandas de 164 y 116 pares de bases en el gel de agarosa luego de la electroforesis, producto del primer y segundo evento de amplificación por PCR, tomando en cuenta lo observado en los controles positivos y negativos.

3.2.4.4. Intensidad de las bandas en los electroferogramas.

La intensidad de las bandas de los productos amplificados en la electroforesis se evaluó de acuerdo al score planteada para el estudio:

Resultado	Intensidad de Bandas
Negativo	—
Positivo tenue	+
Positivo intermedio	++
Positivo intenso	+++

3.2.4.5 Análisis de la sensibilidad y especificidad de los dos eventos de amplificación para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

La amplificación de DNA por PCR tiene las siguientes cualidades: sensibilidad y especificidad. La sensibilidad esta definida como la capacidad de la prueba para amplificar una sola molécula de DNA, logrando a su término que el número de copias de la región amplificada se incrementen en proporción geométrica.

La especificidad esta definida como la capacidad de la prueba para amplificar una región preseleccionada de la muestra del DNA original. Lo cual va a depender de los cebadores empleados.

En el presente trabajo se evaluó el incremento de la sensibilidad y especificidad de la prueba *PCR-Nested*, al observar que productos amplificados (del primer y segundo evento) procedentes de una misma muestra presentaban diferentes patrones de expresión de bandas, lo cual se reflejaba en la no visualización a simple vista de la banda de 164pb del primer evento de amplificación pero sí de la banda de 116pb del segundo evento de amplificación.

IV. RESULTADOS

4.1. Datos demográficos.

La muestra poblacional fue de 43 pacientes, de ambos sexos, con sospecha clínica de tuberculosis y que acudieron al Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular Oncológico “MAMLAB” durante el período Agosto 2006 - Febrero 2007. La edad promedio fue de 45 años; el 70% de la población correspondió al sexo masculino (**Figura N° 8**) y el 100% de ellos reportó como lugar de procedencia la ciudad de Lima (**Tabla N° 7**).

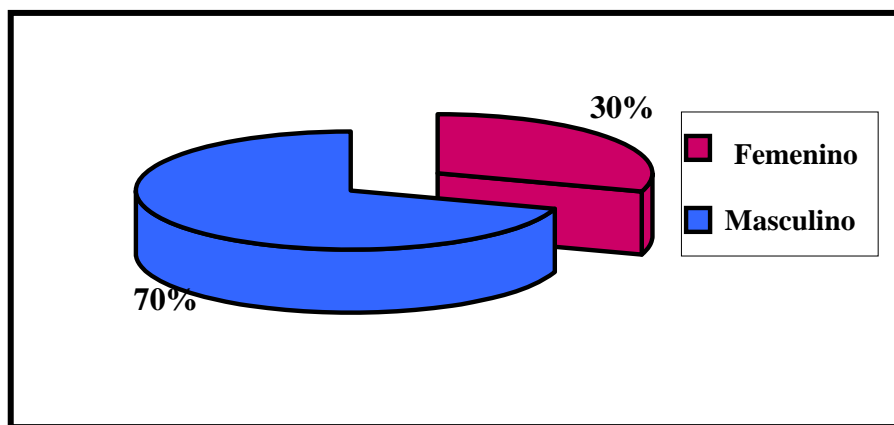


Figura N° 8.- Distribución De Los Casos Estudiados Según Su Género.

Tabla N° 7.- Datos Demográficos De Los Pacientes Estudiados

N° Casos	Edad	Sexo	Procedencia
1	35	F	Lima
2	34	M	Lima
3	58	M	Lima
4	25	M	Lima
5	61	F	Lima
6	40	F	Lima
7	58	M	Lima
8	31	F	Lima
9	61	M	Lima
10	25	M	Lima
11	58	M	Lima
12	21	M	Lima
13	41	M	Lima
14	32	M	Lima
15	45	M	Lima
16	34	F	Lima
17	43	F	Lima
18	74	F	Lima
19	30	M	Lima
20	41	F	Lima
21	46	M	Lima
22	20	M	Lima
23	84	M	Lima

24	68	M	Lima
25	72	M	Lima
26	58	M	Lima
27	47	M	Lima
28	9	F	Lima
29	42	M	Lima
30	49	F	Lima
31	30	M	Lima
32	58	F	Lima
33	34	M	Lima
34	73	M	Lima
35	42	F	Lima
36	69	M	Lima
37	33	M	Lima
38	48	M	Lima
39	45	M	Lima
40	29	M	Lima
41	44	M	Lima
42	52	F	Lima
43	54	M	Lima

Los pacientes fueron clasificados en nueve grupos etáreos, observándose un rango de edades comprendido entre los 9 y 84 años. El mayor número, con 33 casos, fue reportado en el grupo etáreo comprendido entre 21 - 60 años, los cuales a su vez corresponden a los jóvenes y adultos pertenecientes a la población económicamente activa. El segundo grupo etáreo más frecuente, con 8 casos, estuvo comprendido entre los 61 - 90 años, los cuales corresponden a los adultos mayores. Finalmente el menor número de casos fue reportado en los grupos etáreos comprendidos entre los 1 – 20 años, con sólo 2 casos, los cuales corresponden a los niños y adolescentes (**Tabla N° 8**).

Tabla N°8.- Número de Pacientes Por Grupos Etáreos

Grupo Etáreo	N° De Pacientes
1-10	1
11-20	1
21-30	6
31-40	8
41-50	12
51-60	7
61-70	4
71-80	3
81-90	1
Total	43

4.2. Procedencia de las muestras.

4.2.1. Distribución de las muestras según los métodos de obtención del material biológico.

Las 43 muestras correspondieron a material biológico procedente del Tracto Respiratorio Inferior (TRI). El mayor número de muestras fueron obtenidas a partir de aspirado bronquial y lavado bronquial, con el 51 % (22/43) y 25 % (11/43), respectivamente. El resto de muestras fueron obtenidas en menor número, siendo distribuidas de la siguiente manera: aspirado pulmonar 7% (3/43) aspirado bronco-alveolar 5% (2/43), broncofibroscopía 5% (2/43), secreción bronquial 5% (2/43) y lavado bronco-alveolar 2% (1/43), **Figura N° 9.**

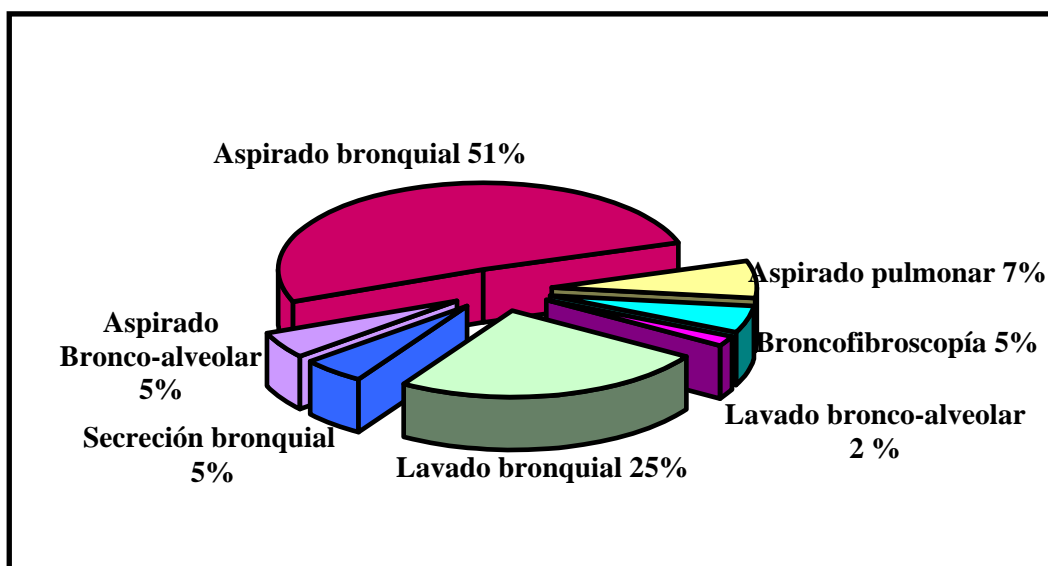


Figura N° 9.- Distribución De Las Muestras Biológicas Según Su Método De Obtención.

4.3. Calidad del material biológico.

4.3.1. Distribución de las muestras según la calidad del material biológico.

La calidad del material biológico fue evaluada de acuerdo al valor planteado, **score**. La mayoría de muestras biológicas procesadas fueron consideradas “**muy buenas**” (24), es decir no presentaban restos de sangre; éstas se distribuyeron en: Aspirado bronco-alveolar (1), aspirado bronquial (14), broncofibroscopía (2), lavado bronquial (6) y

secreción bronquial (1). El segundo grupo más frecuentes fueron las muestras consideradas “**malas**” (8) siendo las portadoras de mayores restos de sangre (+++), las cuales se distribuyeron en: Aspirado bronco-alveolar (1), aspirado bronquial (3), aspirado pulmonar (1) y lavado bronquial (3). Asimismo, la cantidad de muestras biológicas consideradas “**regulares**” (6) fue menor que las anteriores, presentaron una disminución en la cantidad de restos de sangre (++) y estuvieron conformadas por: Aspirado bronquial (3), aspirado pulmonar (1) y lavado bronquial (2). Finalmente, las muestras menos frecuentes fueron las consideradas “**buenas**” (5), las cuales contenían la menor cantidad de restos de sangre (+) y estuvieron conformadas por: Aspirado bronquial (2), aspirado pulmonar (1) lavado bronco-alveolar (1) y secreción bronquial (1), **Tabla N° 9**.

Tabla N° 9.- Score de Calidad Del Material Biológico

Score De Calidad	N° de Muestras	%
Muy Buena	24	56%
Buena	5	12%
Regular	6	14%
Mala	8	18%
Total	43	100%

Cabe resaltar que el **aspirado bronquial** fue el método de obtención mayormente utilizado por los servicios de salud que remitieron las muestras, además el que presentó la mayor cantidad de muestras consideradas “**muy buenas**” y en el que se observó las cuatro variables de calidad planteadas para este estudio (**Tabla N° 10**).

Tabla N° 10.- Score de calidad del material biológico según la procedencia de la muestra.

Método De Obtención	Score de Calidad del Material Biológico				Total
	Muy Buena	Buena	Regular	Mala	
Aspirado bronco-alveolar	1	0	0	1	2
Aspirado bronquial	14	2	3	3	22
Aspirado pulmonar	0	1	1	1	3
Broncofibroscopía	2	0	0	0	2
Lavado bronco-alveolar	0	1	0	0	1
Lavado bronquial	6	0	2	3	11
Secreción bronquial	1	1	0	0	2
Total	24	5	6	8	43

4.4. Geno-Identificación de la secuencia correspondiente a la proteína A (65KDa) de *Mycobacterium tuberculosis* en las muestras biológicas procedentes de pacientes limeños con sospecha clínica de tuberculosis.

La geno-identificación de la secuencia génica responsable de la proteína A (65KDa) de *Mycobacterium tuberculosis* se evidenció mediante la detección de las bandas electroforéticas de 164 y 116 pares de bases, producto del primer y segundo evento de amplificación por PCR, respectivamente. Para identificar errores en la amplificación o contaminación de reactivos se procesaron en paralelo controles positivos y negativos conocidos para cada caso (**Figuras N° 11 y 12**).

Los resultados mostraron que en el 77% (33/43) de las muestras procesadas, se geno-identificó la secuencia de DNA correspondiente al gen que codifica la proteína A de

65KDa de *Mycobacterium tuberculosis* mientras que el 23% (10/43) resultaron negativas (Tabla N°11).

Tabla N° 11.- Resultados “DNA MBT-PCR”

DNA MBT – PCR	N° de Casos	%
Positivo	33	77%
Negativo	10	23%
Total	43	100%

4.4.1 Frecuencia de la secuencia génica de la proteína A (65KDa) de *Mycobacterium tuberculosis* según el método de obtención del material biológico.

Se obtuvo al menos una muestra con resultado positivo en cada uno de los siete métodos de obtención del material biológico (lavado bronquial, aspirado bronquial, aspirado pulmonar, secreción bronquial, lavado bronco-alveolar, aspirado bronco-alveolar y broncofibroscopía).

Las muestras procedentes del aspirado bronquial fueron las más abundantes por ende en este grupo se registró el mayor número de resultados positivos (17) seguido del lavado bronquial (9), aspirado pulmonar (2), broncofibroscopía (2), secreción bronquial (1), lavado bronco-alveolar (1) y aspirado bronco-alveolar (1) (Tabla N°12).

Tabla N° 12.- Frecuencia de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* según el método de obtención de las muestras.

Métodos de obtención de las muestras.	Resultado DNA MBT-PCR		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Aspirado bronco-alveolar	1	1	2
Aspirado bronquial	17	5	22
Aspirado pulmonar	2	1	3
Broncofibroscopía	2	0	2
Lavado bronco-alveolar	1	0	1
Lavado bronquial	9	2	11
Secreción bronquial	1	1	2
Total	33	10	43

4.4.1.1. Perfil molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras biológicas del TRI.

El material biológico procedente del TRI es obtenido directamente desde el sitio de la lesión por lo que es posible establecer un perfil de expresión de *Mycobacterium tuberculosis* en el TRI. Así, nuestros resultados demuestran que la mayor detección de DNA de *Mycobacterium tuberculosis*, es decir el 82%, se dio en la región correspondiente al árbol bronquial superior, mientras que 6% en la región alveolo-bronquial, 6% en árbol traqueo-bronquial y 6% en la región pulmonar (**Tabla N° 13**).

Tabla N° 13.- Perfil molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en el TRI.

Región del TRI	N° de Casos Positivos	%
Árbol bronquial superior	27	82%
Región alveolo-bronquial	2	6%
Árbol traqueo-bronquial	2	6%
Región pulmonar	2	6%
<i>Total</i>	33	100%

5.4.2. Identificación de la secuencia génica de la proteína A (65KDa) de *Mycobacterium tuberculosis* de acuerdo a la calidad del material biológico.

En la mayoría de muestras biológicas consideradas “**muy buenas**” se obtuvo resultados positivos, con un total de 18 casos, lo cual confirma la ausencia de inhibidores de la prueba debido a la buena calidad del material biológico. En segundo lugar se registraron las muestras consideradas “**malas**”, con 7 casos, lo cual demuestra que a pesar de la presencia de inhibidores, tales como restos de sangre, el proceso de extracción de DNA fue lo suficientemente efectivo para eliminar estos contaminantes. Finalmente las muestras consideradas “**regulares**”, con 5 casos, y “**buenas**”, con sólo 3 casos, fueron las que se registraron en menor proporción (Tabla N° 14).

Tabla N° 14.- Frecuencia De MBT Vs Score De Calidad Del Material Biológico

Score de Calidad del Material Biológico	Resultado MBT-PCR		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Muy Buena	18	6	24
Buena	3	2	5
Regular	5	1	6
Mala	7	1	8
Total	33	10	43

4.5. Análisis de la especificidad y sensibilidad de la prueba *PCR-Nested* en la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

4.5.1. Especificidad de la prueba *PCR-Nested* en la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

La especificidad de la prueba *PCR-Nested* está determinada por la capacidad de ésta para amplificar una región preseleccionada de la secuencia génica de la proteína A (65KDa) de *Mycobacterium tuberculosis*, lo cual depende de los cebadores empleados.

En el presente trabajo quedó demostrada la especificidad de la prueba al observar los resultados obtenidos al realizar los ensayos de PCR empleando los cebadores externos “**MTB1001**” e internos “**MTB1003**”, los cuales resultaron positivos al amplificar DNA de *Mycobacterium tuberculosis* aislado de un medio de cultivo (Löwenstein- Jensen) y negativos al amplificar DNA extraído de micobacterias no tuberculosas.

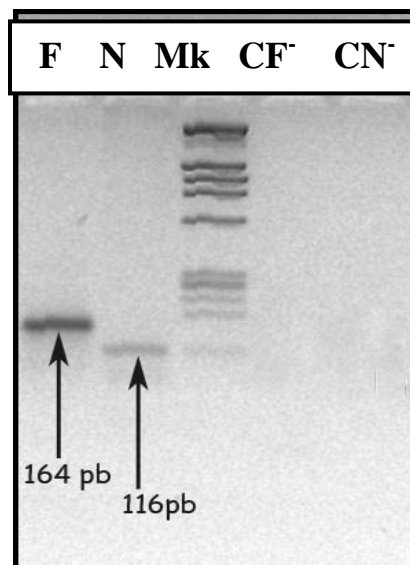


Figura N° 10.- Electroforesis De Los Productos Amplificados Y Sus Controles

Negativos.

F: Primer Evento De Amplificación; **N:** Segundo Evento De Amplificación;

CF y CN⁻: Controles Negativos de First y Nested

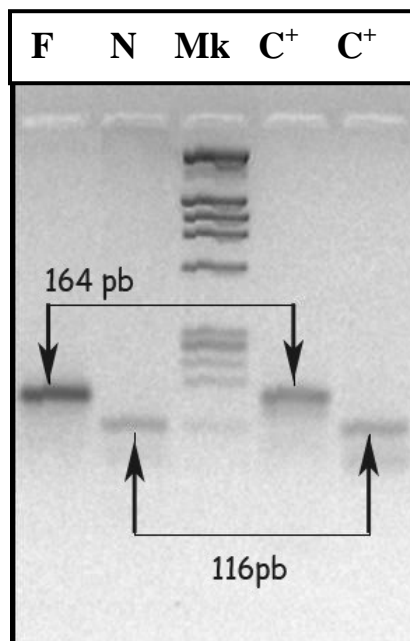


Figura N° 11.- Electroforesis De Los Productos Amplificados Y Sus Controles

Positivos.

F: Primer Evento De Amplificación; **N:** Segundo Evento De Amplificación;

C⁺: Control Positivo

4.5.2. Sensibilidad de la prueba *PCR-Nested* en la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

La sensibilidad de la prueba *PCR-Nested* quedó demostrada al observar los resultados obtenidos en las muestras biológicas procesadas en el presente estudio, debido a que todas correspondían a pacientes con sospecha clínica de tuberculosis, con aparente baja carga bacteriana.

Asimismo, el incremento de la sensibilidad de la prueba quedó demostrado al observar que sólo 14% (6/43) dieron resultados positivos al finalizar el primer evento de amplificación, mientras que aplicando *PCR-Nested* se obtuvieron resultados positivos en el 77% (33/43) de las muestras, lo cual refleja un incremento de la sensibilidad 5.5 veces (Tabla N° 15 y Tabla N°16).

Tabla N° 15.- Frecuencia de DNA MBT detectado mediante *First-PCR*.

DNA MBT PCR- First	N° de Casos	%
Positivo	6	14%
Negativo	37	86%
Total	43	100%

Tabla N° 16.- Frecuencia de DNA MBT detectado mediante *PCR-Nested*.

DNA MBT PCR- Nested	N° de Casos	%
Positivo	33	77%
Negativo	10	23%
Total	43	100%

4.5.3. Patrones de visualización electroforética obtenidos mediante *Nested - PCR* en la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

Al observar los resultados obtenidos de productos amplificados (con un solo evento y con *PCR-Nested*) procedentes de una misma muestra biológica, se decidió establecer 4 patrones diferentes de **visualización electroforética** de la secuencia génica de la proteína A (65KDa) del *Mycobacterium tuberculosis*, los cuales consistían en:

- I.** Visualización **electroforética** de ambas bandas, 164pb y 116pb, correspondientes a los dos eventos de amplificación respectivamente.
- II.** No visualización de la banda de 164pb del primer evento de amplificación y visualización **electroforética** de la banda de 116pb del segundo evento de amplificación.
- III.** Visualización **electroforética** de la banda de 164pb del primer evento de amplificación y no visualización de la banda de 116pb del segundo evento de amplificación.
- IV.** No visualización de las bandas de 164pb y de 116pb correspondientes a los dos eventos de amplificación respectivamente.

Los resultados obtenidos mostraron que la mayoría de muestras biológicas incluidas en este estudio evidenciaron el patrón de visualización **II**, 63% (27/43), lo cual además representa el porcentaje de muestras negativas rescatadas con la aplicación de un segundo evento de amplificación. El segundo grupo más frecuente fue el patrón de visualización **IV**, con 23% (10/43), este grupo representa a todos los casos negativos; y el menos frecuente fue el patrón de visualización **I**, con 14% (6/43), este grupo incluyó a las muestras positivas en los dos eventos de amplificación. Asimismo, ninguna muestra evidenció el patrón **III** (Tabla N° 17).

Tabla N° 17.- Patrones de visualización electroforética post *PCR-Nested*.

Patrones De Visualización	N° De Muestras	%
I	6	14%
II	27	63%
III	0	0%
IV	10	23%
Total	43	100%

Al menos una muestra con el patrón de visualización **II** fue el predominante en la mayoría de muestras ya que fue reportado en cada uno de los siete métodos de obtención del material biológico (lavado bronquial, aspirado bronquial, aspirado pulmonar, secreción bronquial, lavado bronco-alveolar, aspirado bronco-alveolar y broncofibroscopía).

Asimismo, las muestras procedentes del **aspirado bronquial** y del **lavado bronquial** fueron las que reportaron el mayor número de casos positivos (Tabla N°18).

**Tabla N° 18.- Patrones De Visualización Electroforética En Los Diferentes
Métodos De Obtención Del Material Biológico**

Métodos de obtención del Material Biológico	Patrón De Visualización Electroforética				Total
	I	II	III	IV	
Aspirado bronco- alveolar	0	1	0	1	2
Aspirado bronquial	5	12	0	5	22
Aspirado pulmonar	0	2	0	1	3
Broncofibroscopía	0	2	0	0	2
Lavado bronco- alveolar	0	1	0	0	1
Lavado bronquial	1	8	0	2	11
Secreción bronquial	0	1	0	1	2
Total	6	27	0	10	43

V. DISCUSIÓN

5.1. Procedencia de las muestras.

El material biológico procedente del TRI nos permite identificar de manera específica el agente etiológico causante de los procesos infecciosos que suelen afectar a esta región del Tracto Respiratorio, como lo son los hongos, virus y bacterias. Sin embargo, se ha determinado que *Mycobacterium tuberculosis* es el agente etiológico más frecuente de las infecciones crónicas presentes en el TRI (López-Goñi I., 2005).

El TRI suele ser estéril en condiciones normales tal como lo señala Cercenado E. y cols. (2007), sin embargo, también refiere como una de las principales limitaciones del diagnóstico microbiológico de las infecciones de esta región a la contaminación de las muestras con microorganismos potencialmente patógenos que forman parte de la flora normal del tracto respiratorio superior, principalmente las procedentes de esputo. Considerando este punto crítico, las muestras de nuestro estudio fueron obtenidas directamente desde el sitio de la lesión tal como lo sugieren otros investigadores a partir de métodos basados en la instalación del broncofibroscopio, ya que este permite obtenerlas directamente desde el sitio de la lesión, como es el caso de aspirado bronquial, lavado bronquial, lavado bronco-alveolar, aspirado bronco-alveolar, broncofibroscopía y secreción bronquial, otros como el aspirado pulmonar son obtenidos por punción (Ferrán R. 2001).

No se ha reportado en nuestra población estudios de detección de *Mycobacterium tuberculosis* en áreas específicas del TRI, por lo que uno de los principales hallazgos de esta investigación es la identificación del árbol bronquial como foco de diseminación de los bacilos a otras partes del pulmón y al medio ambiente, específicamente en el estadio 5 del proceso patogénico de la tuberculosis pulmonar. Así lo demuestran nuestros resultados en los cuales observamos un predominio de DNA de *Mycobacterium tuberculosis*, 82%, detectado en la región correspondiente al árbol bronquial superior (Tabla N° 13).

En vista de ello el estudio de material biológico procedente del TRI, resulta ser sumamente importante ya que no sólo nos permite evidenciar el desarrollo de la infección en una región específica del tracto respiratorio sino que además nos ayuda a establecer un Perfil molecular del DNA de *Mycobacterium tuberculosis* de acuerdo a la diseminación del bacilo.

5.2. Calidad del material biológico.

El éxito de un proceso de diagnóstico molecular mediante la amplificación por PCR, método altamente sensible y de gran riesgo de contaminación por ende riesgo de falsos positivos, depende principalmente de 3 factores: Heterogeneidad de las muestras biológicas (diferencia en el contenido del patógeno), manipulación del material biológico y presencia de inhibidores en la amplificación (Loera-Castañeda y cols, 2003).

La diferencia en el contenido del patógeno de una muestra a otra, en este caso de bacilos de *Mycobacterium tuberculosis*, depende a su vez del grado de lesión que presente cada paciente y estadio de la enfermedad, en el caso de estadios avanzados y lesiones graves la tuberculosis se hará evidente desde el punto de vista clínico (Baciloscopía, cultivo y radiografías) mientras que en los estadios iniciales pasará desapercibida. De allí la importancia de nuestro estudio en incorporar un método de detección mucho más sensible y rápido como la *PCR- Nested*, el cual tiene un límite de detección de hasta 10^{-1} UFC (Unidades Formadoras de colonias) equivalente a 2 células de *M. tuberculosis*, tal como lo señalaron Miyazaki et al, en 1993.

La manipulación del material biológico desde la toma de la muestra hasta la llegada al laboratorio para su procesamiento fueron factores externos no manejados en este estudio por lo que solo se sugirieron a los laboratorios donde se tomaron las muestras consideraciones generales, pero muy importantes, como la recepción de las muestras en recipientes nuevos, estériles y perfectamente cerrados, el traslado de éstos en contenedores estériles a 4°C, y en un plazo máximo de 2 horas desde su colección, tal como lo sugiere también Ferrán, 2001.

La presencia de inhibidores en las muestras determina la calidad del DNA diana empleado para la reacción, al mismo tiempo, esto depende del método de extracción empleado (González y cols., 2004). En nuestro estudio empleamos el protocolo de

extracción de DNA para células frescas estandarizado por MAMLAB (2007) con ligeras variaciones, el cual nos proporcionó óptimos resultados ya que el valor promedio de la concentración de DNA detectada espectrofotométricamente fue 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Si consideramos que el volumen usado para resuspender el DNA liofilizado fue 50 μl entonces hemos obtenido un promedio de 40 μg para cada muestra, ahora para cada mezcla de reacción se usó 5 μl de DNA que vendría a ser 4 μg de DNA para cada PCR, esto para un volumen final de 50 μl , por lo tanto la concentración de DNA usada en esta tesis fue la adecuada, considerando que es casi una norma el uso de 0.5 a 1 μg (Velazco R., 2000).

Aunque se obtuvieron buenos resultados mediante la lectura de Densidad Óptica (O: D) en el espectrofotómetro, sus valores a veces no sólo reflejan la presencia de DNA en las muestras sino también la presencia de otros componentes celulares, tales como proteínas y restos celulares, los cuales pueden actuar como inhibidores biológicos durante el proceso de amplificación. Tal como lo señalan González y cols., 2004, quienes determinaron que alrededor del 15% de las muestras de origen respiratorio pueden contener estos inhibidores y además describieron como los principales a la hemoglobina y múltiples proteínas.

Nosotros consideramos importante registrar las características externas de las muestras que indiquen la presencia de posibles inhibidores de la prueba para evitar los falsos negativos. Una de ellas fue la presencia de restos de hemoglobina, tal como lo reportara González y cols., 2004, por lo que decidimos evaluarla como principal inhibidor de la reacción de PCR.

Si bien nuestros resultados no demuestran el efecto de la hemoglobina sobre la mezcla de reacción nosotros podemos afirmar que el método de extracción de DNA empleado en este estudio fue lo suficientemente efectivo como para eliminarlos, reflejándose ello en la observación de que la mayoría de muestras con score de **“malas”**, resultaron positivas (Tabla N°14).

5.3 Geno-Identificación de la secuencia correspondiente a la proteína A (65KDa) de *Mycobacterium tuberculosis* en las muestras biológicas procedentes del TRI de pacientes limeños con sospecha clínica de tuberculosis.

Decidimos estudiar la secuencia génica de la proteína A (65KDa) de *Mycobacterium tuberculosis* debido a que nos permite identificar a todas las especies pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* que causan tuberculosis y además se mantiene estable en las diferentes muestras biológicas, lo cual coincide con lo observado por Morishi et al en el 2004, al analizar diferentes primers para diferentes dianas génicas como: IS6110, 65kDa, 38kDa y MPB64, demostraron la presencia de la secuencia génica de la proteína A (65KDa) en todas las cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* analizadas.

Sumado a esto, la detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR es mucho más rápida y posee mayor sensibilidad con respecto a los métodos microbiológicos tradicionales, baciloscopía y cultivo. Así lo demostraron los trabajos realizados por Morán y cols, en el 2000, y Nava y cols, en el 2005.

Nuestros resultados demuestran la geno-identificación de la secuencia correspondiente a la proteína A (65KDa) de *Mycobacterium tuberculosis* en la mayoría (77%) de las muestras biológicas procedentes del TRI de pacientes limeños con sospecha clínica de tuberculosis. Estos resultados a parte de ser muy confiables demuestran la alta sensibilidad y especificidad del método empleado, coincidiendo ello con los resultados obtenidos por Pierre et al, en 1991 y Miyazaki et al, en 1993, los cuales demostraron que la detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante protocolos de reamplificación, *PCR-Nested*, incrementa la sensibilidad de la prueba sin sacrificar la especificidad, siendo superior con respecto a la PCR de un solo evento de amplificación y a los métodos microbiológicos clásicos.

5.3.1. Patrones de visualización electroforética obtenidos mediante *PCR-Nested* en la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

Los resultados obtenidos mostraron que la mayoría de muestras biológicas (63%) incluídas en este estudio expresaron el patrón de expresión **II**, lo cual además representa el porcentaje de muestras negativas rescatadas por la aplicación de un segundo evento de amplificación (Tabla N°17). Esto demuestra el incremento de la sensibilidad del

método empleado en 5.5 veces con respecto a un solo evento de amplificación. Estos datos coinciden con los obtenidos por Miyazaki et al en 1993, quienes evaluaron la sensibilidad de la *PCR-Nested* usando diluciones bacterianas seriadas. Ellos encontraron que el límite de detección de un solo evento de amplificación para *Mycobacterium tuberculosis* fue de 10^2 UFC, mientras que para el *PCR-Nested* la sensibilidad se vio incrementada hasta 1000 veces y obtuvieron un límite de detección mayor, es decir 10^{-1} UFC, lo cual equivale a 2 células de *M. tuberculosis*. Otros autores como Pierre et al en 1991, compararon la sensibilidad total de este método con respecto al cultivo y la baciloscopía encontrando que la *PCR-Nested* (63%) es mucho más sensible que el cultivo (41%) y la baciloscopía (41%) y además es capaz de detectar *M. tuberculosis* en muestras que contenían menos de 10^2 UFC, límite de detección inusual con los protocolos de un solo evento de amplificación. Sin embargo, la no visualización de la banda en el primer evento de amplificación también se le puede atribuir a un producto amplificado en menor proporción no detectable a simple vista, ya que a pesar de que la detección del DNA mediante *PCR-Nested* es un método molecular muy sensible los procedimientos para evidenciar los productos amplificados, como la electroforesis en gel de agarosa, sigue siendo un método cualitativo que depende en gran medida de la experiencia del investigador para poder definir la presencia o no de una banda.

Por lo antes expuesto podemos concluir que el incremento de la sensibilidad de la prueba en 5.5 veces demuestra la utilidad del *PCR-Nested* en material biológico con baja carga bacteriana como las muestras procedentes del TRI.

El segundo grupo más frecuente fue el patrón de expresión **IV**, con 10 casos (23%), este grupo representa a todos los casos negativos, en los cuales no se observó ningún producto de amplificación en la electroforesis. Estos casos corresponderían a otros procesos infecciosos con sintomatología clínica similar ya que la región correspondiente al TRI es susceptible de ser colonizada por bacterias, virus, levaduras, hongos, micobacterias atípicas, etc.

El menos frecuente fue el patrón de expresión **I**, con 6 casos (14%), este grupo incluyó a las muestras positivas en los dos eventos de amplificación. Según Miyazaki et al y Pierre et al se tratarían de muestras con carga bacteriana mayor a 10^2 UFC. Estos casos corresponderían a individuos con tuberculosis en estadio 5, ya que en este estadio el bacilo evade la respuesta inmune del hospedero y se multiplica en el medio extracelular,

alcanzando un enorme número e invadiendo el árbol bronquial así como dispersándose por otras partes del pulmón y también en el medio ambiente, principalmente a través de la tos del paciente (Said, 2005).

Finalmente, ninguna muestra expresó el patrón **III**, es decir, positiva en el primer evento de amplificación y negativa mediante *PCR-Nested*. Lo que significa que además de incrementar la sensibilidad se mantiene la especificidad mediante esta prueba, ya que se mantuvo la capacidad de la prueba para amplificar una región preseleccionada de la muestra del DNA original, en este caso el primer evento de amplificación.

Al menos una muestra con el patrón de expresión **II** fue reportada en cada uno de los siete métodos de obtención del material biológico. Lo cual demuestra que los resultados obtenidos no dependen del método de obtención del estudio sino del paciente.

Asimismo, las muestras procedentes del aspirado bronquial y el lavado bronquial fueron las que reportaron el mayor número de casos positivos, por consiguiente, en estas se observó el mayor número de muestras con el patrón de expresión **II**. Lo cual demuestra la diseminación de *Mycobacterium tuberculosis* a través del árbol bronquial al evadir la respuesta del hospedado (Tabla N° 18).

5.4. Análisis de la sensibilidad y especificidad de los dos eventos de amplificación para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

Usando el *PCR-Nested* como método de investigación hemos demostrado la presencia del DNA de *Mycobacterium tuberculosis* en 33 de las 43 muestras (77%), mientras que las 10 restantes (23%) resultaron negativas (Tabla N° 16). Estos resultados, además de ser confiables demuestran el incremento de la sensibilidad de la prueba en 5.5 veces, ya que sólo 6 de las 43 muestras (14%) dieron resultados positivos al finalizar el primer evento de amplificación (Tabla N° 15). De haberse realizado sólo el primer evento de amplificación no se habría llegado al diagnóstico confirmatorio de tuberculosis en 27 pacientes (Tabla N°16).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Pierre et al, 1991, que al aplicar *PCR-Nested* en 35 muestras procedentes de pacientes con tuberculosis, negativas para el cultivo, obtuvieron resultados positivos en 13 de ellas, obteniendo una sensibilidad total (63%) superior con respecto al cultivo y a la baciloscopía (41%). Se descarta que la baja sensibilidad obtenida al emplear un solo evento de amplificación se deba a inhibidores

de la enzima *Taq polimerasa* ya que ambos eventos de amplificación fueron llevados a cabo en las mismas condiciones. Sin embargo, la baja sensibilidad se le puede atribuir a la baja carga bacteriana presente en las muestras, como lo demuestran los trabajos realizados por Pierre et al, en 1991, Miyazaki et al, en 1993, y Palma y cols, en 2007, los cuales encontraron que los protocolos de amplificación estándar suelen ser negativos en muestras con $<10^2$ UFC/ml y que el empleo de la *PCR-Nested* puede incrementar la sensibilidad de detección hasta 1000 veces, esto significa que mediante este método se puede detectar hasta dos células de *Mycobacterium tuberculosis* por ml de muestra.

Estos datos resultan ser sumamente importantes ya que las muestras procedentes del TRI son un material biológico importante de estudiar que nos permite identificar la región específica de la infección, sin embargo presentan una gran desventaja ya que la mayoría de métodos que obtienen material biológico procedente del TRI recuperan una baja cantidad de micobacterias, tal es el caso de los lavados o aspirados, obtenidos mediante broncofibroscopio, que en sus procedimientos instilan entre 120 y 200ml de solución salina fisiológica y recuperan sólo entre el 30 y 70% de solución, además cabe resaltar que desde la toma de muestra hasta el envío al laboratorio para su análisis suele perderse material biológico debido muchas veces al manejo inadecuado de las muestras.

Por otro lado, es importante considerar que la baja carga bacteriana no solo se debe a este manejo inadecuado de las muestras sino también a que sólo el 5% de individuos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* desarrollan la enfermedad, mientras que el 95% restante puede permanecer con algunos focos residuales de infección conteniendo unos pocos bacilos vivos o restos de ellos, además la mayoría suelen ser positivos a la prueba de PPD o tuberculina, como lo sugiere Torres C., 1998. Dentro de este porcentaje podrían estar incluidos los 27 casos que representan el incremento de la sensibilidad en 5.5 veces, por ello, es importante destacar que si bien el *PCR-Nested* constituye una herramienta de diagnóstico muy sensible, la interpretación de sus resultados deben ser complementados con los datos clínicos del paciente, para evitar dar resultados falsos positivos.

Otros investigadores como González y cols 2004, sugieren que en el caso de observar un resultado de cultivo negativo y un *PCR-Nested* positivo, se trataría de un falso positivo si la detección de DNA fuera de micobacterias no viables o restos de ellas,

como consecuencia de que el paciente esté recibiendo tratamiento en el momento de obtención de la muestra, lo haya recibido parcialmente o completo en los últimos 1-2 meses o quizás haya tenido un proceso clínico anterior. En el caso de que ambos resultados fueran positivos se confirmaría el diagnóstico.

En el caso de la baciloscopía negativa y *PCR-Nested* positivo, de darse este resultado se confirmaría el diagnóstico de tuberculosis debido a la baja sensibilidad de la primera, sin embargo, si la baciloscopía resultará positiva y *PCR-Nested* negativo se trataría probablemente de un falso positivo, luego de descartar un error en la ejecución de la prueba, ya que la baciloscopía no es específica y podría tratarse de micobacterias no tuberculosas e incluso de otros microorganismos con propiedades tintoriales de ácido-resistencia, como *Nocardia spp* como lo sugirieron Laniado y cols, en el 2005.

Los falsos positivos también podrían ser consecuencia de una contaminación cruzada y diseño incorrecto de los cebadores, lo cual en el presente trabajo quedaría descartado ya que cada muestra fue amplificada con un control positivo (DNA extraído de colonias de *Mycobacterium tuberculosis* crecidas en medio de cultivo) y uno negativo (DNA extraído de colonias de micobacterias no tuberculosas). Adicionalmente, se tomaron en cuenta las medidas de bioseguridad adecuadas, como esterilización y separación de las áreas de trabajo, para evitar este tipo de problemas.

Finalmente, la alta sensibilidad demostrada de la prueba *PCR-Nested* sugiere su aplicación en otro tipo de material biológico con baja carga bacteriana como los estudiados para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar tales como LCR, orina, sangre, efusiones pleurales, etc.

VI. CONCLUSIONES

- Se detectó DNA de especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* a lo largo del Tracto Respiratorio Inferior, registrándose la mayor frecuencia en el árbol bronquial superior (82%).
- La aplicación de la prueba *PCR-Nested* demuestra la presencia del DNA de *Mycobacterium tuberculosis* en el 77% de muestras biológicas procedentes del Tracto Respiratorio Inferior de pacientes limeños con sospecha clínica de tuberculosis.
- La prueba del *PCR-Nested* permite rescatar los falsos negativos a *Mycobacterium tuberculosis* que ocurren con la aplicación de un solo evento de amplificación.
- La aplicación de la prueba *PCR-Nested* incrementa la sensibilidad de detección del DNA de *Mycobacterium tuberculosis*, sin sacrificar la especificidad, 5.5 veces más con respecto a un solo evento de amplificación, lo cual demuestra la utilidad de esta prueba en el análisis de material biológico con baja carga bacteriana.

VII. RECOMENDACIONES

- Evaluar la utilidad de la prueba *PCR- Nested* en el diagnóstico confirmatorio de tuberculosis extrapulmonar.
- Evaluar la sensibilidad de la prueba *PCR-Nested* en otros tipos de material biológico con baja carga bacteriana como líquido cefalorraquídeo, orina, sangre, líquido pleural, etc.
- Incorporar los métodos de biología molecular, tales como la *PCR-Nested*, en el diagnóstico confirmatorio de la tuberculosis.
- Determinar el perfil molecular de *Mycobacterium tuberculosis* a lo largo de todo el Tracto Respiratorio.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agapito J, Neyra V, Castro J, Accinelli R, Rodríguez I, y Espinoza J. 2002. Caracterización de las mutaciones en el gen *rpoβ* asociadas a la resistencia a rifampicina en pacientes con tuberculosis pulmonar. Revista Peruana de Medicina Experimental Salud Pública. 19(3): 117-123.
2. Baldeviano C, Quispe N, Bonilla C, Gastiaburu D, Pro J, Llanos-Zavalaga L. 2003. Perfiles genéticos (RFLP- IS6110) y resistencia a drogas en aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes internados en un hospital referencial del Callao, Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental Salud Pública. (20)2.
3. Barrera L. 2000. La tuberculosis vista con el lente de aproximación de la biología molecular. Medicina. 60(1):17-25.
4. Barrón H, Monteghirfo M. y Rivera N. 2006. Diagnóstico molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en biopsias pleurales embebidas en parafina. Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 67(1): 11-18.
5. Calderón R, Asencios L, Quispe N, Custodio W. y Montoya Y. 2003. Detección rápida de resistencia a drogas en *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR-SSCP y PCR- Heteroduplex. Revista Peruana de Medicina Experimental Salud Pública. 20(2):65-71.
6. Carmona O, Gómez M.J, Montes T, Marcano C. y Mariño F. 1997. Microbiología Médica de Divo. 5ta Edición. Editorial Mc Graw-Hill-Interamericana. México.
7. Cercenado E. y Cantón R. 2007. Procedimientos en Microbiología Clínica. 2007. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 25(7): 496.

8. Clinica Universidad de Navarra. Area de Salud. 2008. [Online] www.cun.es/en/areadesalud/pruebasdiagnosticas.htm.
9. Cole S.T, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon S.V, Eiglmeier K, Gas S, Barry III C.E, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D. et al. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from complete genome sequence. Nature. 393: 537-544.
10. Core Curriculum on Tuberculosis (2000): Core Curriculum on Tuberculosis (2000). Internet version, subject to continuous updates. [Online] www.cdc.gov/nchstp/tb/pubs/corecurr/default.htm.
11. De La Parte-Pérez M, Hurtado M.P. y Rivera M. 2001. Tuberculosis en el Nuevo Milenio. Revista de la Facultad de Medicina 24(2): 104-119.
12. Enciclopedia Británica.1998. [Online]. www.britannica.com/EBchecked/topic-art/468736/18071/The-three-step-process-of-the-polymerase-chain-reaction.
13. Ferrán R. 2001. Procesamiento de las muestras del tracto respiratorio inferior. Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 84-607-3050-6.
14. Garza-Velasco R. 2007. Apuntes: Patología asociada al género *Mycobacterium* Departamento de Programas Audiovisuales. Facultad de Química UNAM.
15. González J. y Juárez S. Técnicas de detección genética en el diagnóstico rápido de las micobacteriosis. Utilidad y estrategia de aplicación. Centro de Diagnóstico Biomédico Hospital-Clínica IDIBAPS, Universidad de Barcelona, 2004.
16. Jawetz E, Mulnick J. L. y Adelberg E.A. 1992. Microbiología Médica. 4ta. Edición. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. México D.F. Pp 289-295.
17. Ingraham J. L. 1998. Introducción a La Microbiología.1ra Edición. Editorial Reverté S.A. Barcelona. Capítulo23.

18. Laniado- Laborín R. y Cabrales- Vargas N. 2005. No siempre una baciloscopia positiva indica tuberculosis: Otra razón para solicitar cultivos rutinariamente. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 18(4): 286-289.
19. Laniado- Laborín R, Enríquez- Rosales M.L. y Licea- Navarroll A.F. 2001. Diagnóstico de tuberculosis mediante detección de *Mycobacterium tuberculosis* empleando un sistema no comercial de reacción en cadena de la polimerasa. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 14 (1): 22-26.
20. Loera-Castañeda V, Sánchez-Corona J. y Morán-Moguel M.C. 2003. El papel de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico y control de la tuberculosis. *Gaceta Médica de México*. 139 (3): 288-290.
21. López-Goñi I, Díaz R. y Gamazo C. 2005. Manual Práctico De Microbiología. 3ra Edición. editorial Elsevier España. Pp 111-112.
22. Madigan M.T, Martinko J.M. y Parker J. 1999. Brock Biología de los Microorganismos. 8va. Edición. Editorial Prentice Hall Iberia. Madrid Pp 734-736.
23. Maldonado E. 1998. Biología Molecular en Medicina. Editorial Limusa. México. Pp. 51-53.
24. MAMLAB. Laboratorio de Investigación y Diagnostico Molecular Oncológico. 2007. Manual de Procesamiento de Muestras Biológicas. Pp 15-17.
25. Maturrano L, Pérez D, Llanco L, Londoño P, Castillo H, Veliz A, y cols. 2007. Aplicación de técnicas moleculares en investigación y diagnóstico, Manual de Prácticas. Laboratorio de Biología y Genética Molecular FMV-UNMSM.
26. Mendoza A, y Gotuzzo E. 2008. Tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR), historia y situación actual. *Acta Médica Peruana* 25(4).

27. Ministerio de Salud 2007, Prevención y Control de Tuberculosis, Estrategia Sanitaria Nacional de Tuberculosis.
28. Ministerio de Salud 2009, Plan Estratégico Multisectorial de la Respuesta Nacional a la Tuberculosis en el Perú 2009 - 2018.
29. Miyazaki Y, Koga H, Kohno S. and Kaku M. 1993. Nested Polymerase Chain Reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 31(8): 2228-2232.
30. Morán-Moguel M.C, Aceves H.D, Peña Montes de Oca P.M, Gallegos AMP, Flores MSE, Montoya F.H, Figuera V.L.E, Villa M.L, y Sánchez C.J. 2000. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante reacción en cadena de la Polimerasa en una población seleccionada del noroccidente de México. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 7(6): 389-393.
31. Morishi M. and Ignez J. 2004. Analysis of different primers used in the PCR method: diagnosis of tuberculosis in the state of Amazonas, Brazil. *Journal Brazilian of Pneumology*. 30(4): 433-439.
32. National Center for Biotechnology Information (NCBI) 2008. [Online] www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser.
33. Nava O, Hassanhi M. y Prieto L. 2005. Evaluación de la baciloscopía, cultivo y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. *Kasmera*. 33(2): 119-131.
34. Organización Mundial de la Salud. 2007. Tuberculosis: Nota descriptiva OMS N° 104.
35. Organización Panamericana de la Salud. 2008. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y Guía Técnica-Parte 1 Baciloscopía.

36. Organización Panamericana de la Salud. 2008. Manual Para El Diagnóstico Bacteriológico De La Tuberculosis. Normas y Guía Técnica-Parte 2 Cultivo.
37. Palma-Nicolás J.P. y Bocanegra-García V. 2007. Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tuberculosos. Archivos de Bronconeumología. 43(4): 225-232.
38. Palomino J C, Leão S. C. and Ritacco V. Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. [Online] www.TuberculosisTextbook.com.
39. Pierre C, Lecossier D, Boussougant Y, Bocart D, Joly V, Yeni P. and Hance A. 1991. Use of reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. Journal of Clinical Microbiology. 29 (4): 712-717.
40. Ponce de León A. 2007. Revolución en el control de la tuberculosis. Salud Pública de México. 49: 208-210.
41. Prescott L.M, Harley J.P. y Klein D.A. 1999. Microbiología. 4ta. Edición. McGraw.Hill-Inter-Americana, Madrid.
42. Rodríguez I. y Barrera H. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia-UANL 8(3): 323-335.
43. Russell D. G. 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. Nature Reviews Molecular Cell. 2:569-586.
44. Said-Fernández S, Becerrill-Montes P, Molina-Salinas G, Barrios-García H. y Vargas-Villarreal J. 2005. Tuberculosis causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogoresistentes. Enfermedades Emergentes. 7(1): 13-19.
45. Salazar G, Schmitz T, Cama R, Sheen P, Franchi L, Centeno G, Valera C, Leyva M, Montenegro-James S, Oberhelman R, Gilman R, Thompson M. and Working

- Group on TB in Peru. 2001. Pulmonary tuberculosis in children in a developing country. *Pediatrics*. 108(2): 448-453.
46. Sambrook J, Fritsch E, Manniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2da.ed.1989; Tomo I y II. Col Spring Harbor Laboratory Press. Ny.USA.
47. Santillán C. 2002. Detección de DNA del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes con sospecha de tuberculosis pleural; evaluación del uso de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). Tesis. Universidad Peruana Cayetano Heredia.
48. Shinnick T.M. 1987. The 65-Kilodalton Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*.169(3): 1080-1088.
49. Sjöbring U, Mecklenburg M, Bengård A, and Miörner H. 1990. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(19): 2200-2204.
50. Stewart GR, Robertson BD, Young DB Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol*. 2003; 1(2): 97 - 105.
51. Torres C. 1998. Tuberculosis y otras micobacteriosis respiratorias. In: Velez H, Rojas W, Borrero J, Restrepo J. *Fundamentos de Medicina. Neumología*. 5ta. Edición. Medellín. Colombia. Editorial CIB. Pp 155-86.
52. United States National Library of Medicine – National Institutes of Health. MedLinePlus.2006.[Online].http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/19379.htm.
53. Velazco R. 2000. Presencia de ADN del virus Epstein-Barr y determinación de su actividad transcripcional en linfoma nasal: Rol del virus en la muerte celular programada. Tesis de Grado UNSCH. Ayacucho -Perú.